

**Bildung von
 β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym A
aus β -Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A
(Enzymreaktionen beim biologischen Abbau
von Leucin)**

Joachim Knappe



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Bildung von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym A
aus β -Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A

(Enzymreaktionen beim biologischen Abbau von Leucin)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Joachim Knappe

aus

München

November 1957



Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 1957

Meinen Eltern

in Dankbarkeit

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1955 bis August 1957 am Max-Planck-Institut für Zellchemie in München ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer

Herrn Prof. Dr. F. Lynen

danke ich herzlich für das Interesse und für die Unterstützung, die er meiner Arbeit jederzeit entgegenbrachte.

An dieser Stelle möchte ich auch

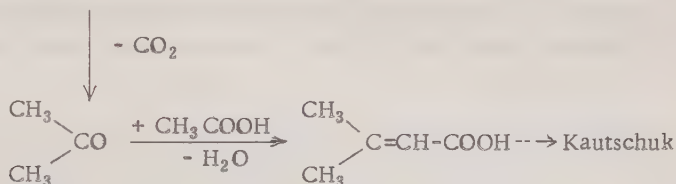
Herrn Dr. H. G. Schlegel

für die Überlassung eines Bakterienstamms und für wertvolle technische Anleitung danken.

	Seite
<u>Einführung</u>	1
<u>Ergebnisse</u>	
I. Die enzymatische Carboxylierung von β -Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A	7
1. Nachweis der Reaktion	7
a) Enzymtest	7
b) Substrate	10
2. Versuche mit Ochsenleber	11
a) Enzymanreicherung	11
b) Eigenschaften	12
3. Versuche mit Mycobacterium spp.	14
a) Anreicherung der Carboxylase	15
b) Der Bedarf an Crotonase	16
c) Der Abbauweg von Isovaleryl-Coenzym A	23
d) Eigenschaften der Carboxylase	26
e) Bestimmung der Reaktionsprodukte	30
f) Der Mechanismus der Carboxylierungsreaktion	37
II. Eigenschaften des β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym A spaltenden Enzyms	44
III. Nachweis einiger Enzymreaktionen	49
1. Hydrolyse von p-Nitroacetanilid	49
2. Aktivierung von Acetessigsäure	51
3. Befunde zur Bildung von Acetessigsäure	53
IV. Thiolester	56
1. Thiolester der β -Methyl-crotonsäure	56
2. Reaktivität substituierter Thiolester	57
<u>Experimenteller Teil</u>	
I. Die optischen Enzymbestimmungen	62
II. Bestimmung der Reaktionsprodukte	67
III. Enzympräparate	71

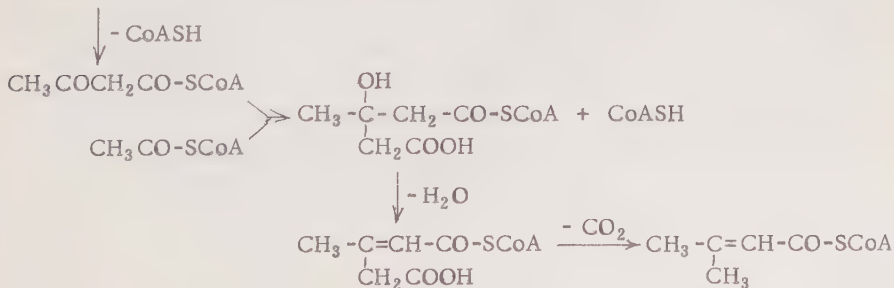
1. Arylamin-transacetylase	71
2. Desmolase-Präparat aus Leber	73
3. Carboxylase-Präparat aus Mycobacterium	74
4. Carboxylase-Präparat aus Leber	78
5. Faktor II (Crotonase) aus Leber	80
6. Hemmung der Desmolase durch p-Chlormercuribenzoat	82
7. Versuche zur Abtrennung von Desmolase in Mycobacterium-Präparaten	84
IV. Coenzym A-Derivate	86
1. β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym A	86
2. β -Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A	87
3. Isovaleryl-Coenzym A	89
4. β -Methyl-crotonyl-Coenzym A	90
V. N-Acyl-cysteamin-Derivate	94
1. S-(β -Methyl-glutaryl)-N-acetyl-cysteamin	94
2. S-(β -Hydroxy-isovaleryl)-N-acetyl-cysteamin	95
3. S-(β -Methyl-crotonyl)-N-succinyl-cysteamin	97
VI. Spaltung der Thiolester	101
1. Alkalische Hydrolyse	101
2. Hydroxylaminolyse	105
3. Ammonolyse	107
<u>Zusammenfassung</u>	109
Literaturverzeichnis	112

Die Beschäftigung mit dem Problem der biologischen Synthese jener Naturstoffe, die sich nach der Regel von RUZICKA (Lit. 1) von Isopren ableiten, hat im vergangenen Jahrzehnt das Interesse am Stoffwechsel gewisser verzweigter Carbonsäuren hervorgerufen. Die Entwicklung nahm ihren Ausgang von der Beobachtung von BONNER u. ARREGUIN (Lit. 2) im Jahre 1949, dass Guayule ausser Glycerin, Aceton oder Essigsäure zum Aufbau von Kautschuk auch β -Methyl-Crotonsäure heranziehen kann. Die Autoren vermuteten in dieser Säure oder einer ihr verwandten Verbindung den biologischen Isoprenkörper, der zur Kondensation zu Terpenen und anderen Polyisoprenoiden befähigt ist. Für seine Bildung schlugen sie einen Weg aus Essigsäure vor, die seit längerem als Kohlenstoffquelle der Polyisoprenoide bekannt war.



Die Entwicklung der Vorstellungen über die Reaktionsweise der Essigsäure in der Zelle, die im Jahre 1951 zur Entdeckung der „aktivierten Essigsäure“ — des Acetyl-Coenzym A — durch LYNEN (Lit. 3), zur Aufstellung des Fettsäurecyclus (Lit. 8) und zur Kenntnis einer vielfältigen Rolle der Coenzym A-Thioester im Intermediärstoffwechsel führte, liess jedoch erwarten, dass die Synthese der β -Methyl-crotonsäure von Acetyl-Coenzym A ausgeht und das Coenzym A-Derivat der C_5 -Säure liefert.

Ein entsprechendes Schema wurde 1951 von LYNEN (Lit. 4), später von BLOCH (Lit. 5), LIPMAN (Lit. 6) u.a. aufgestellt. Es beseitigte gleichzeitig den Mangel der BONNERSchen Hypothese, wonach Aceton ein Zwischenprodukt darstellt, während Isotopenversuche eine direkte Beteiligung von Acetessigsäure, ohne vorhergehende Spaltung zu Aceton, anzeigten (Lit. 7).



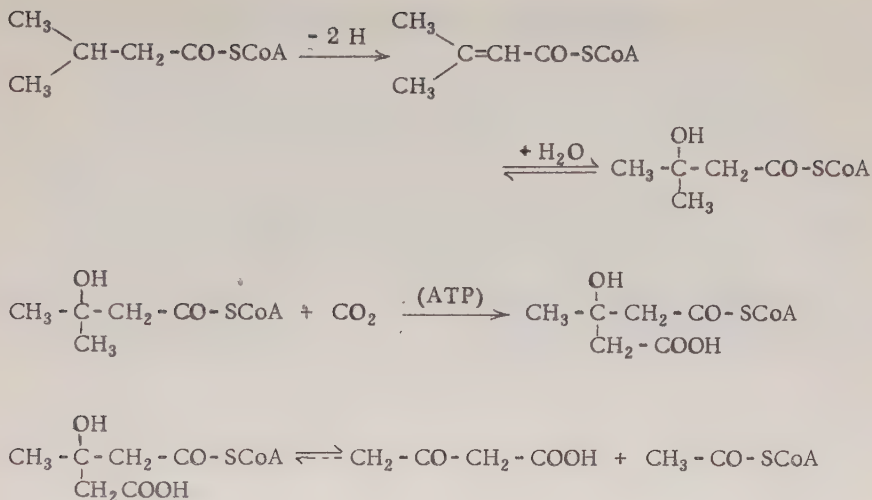
Das Kernstück des Prozesses liegt in einer Kondensation von Acetyl-Coenzym A mit Acetacetyl-Coenzym A, welches letzteres von der Thiolasereaktion des Fettsäurecyclus geliefert wird. Von dem hierbei entstehenden β -Hydroxy- β -methylglutaryl-Coenzym A führt sodann ein Dehydratisierungs- und Decarboxylierungsschritt zum Thiolester der Methylcrotonsäure.

Eine erste Bestätigung ~~erfuhr~~ das Schema, als die Fähigkeit von Enzymsystemen der Leber sowie von pflanzlichen Geweben entdeckt wurde, aus ^{14}C -Acetat β -Hydroxy- β -methyl-glutarsäure (Lit. 9, 10) und β -Hydroxy-isovaleriansäure (Lit. 11) sowie deren Dehydratisierungsprodukte β -Methyl-glutaconsäure und β -Methyl-crotonsäure (Lit. 12) zu synthetisieren. Die für den Fall der β -Hydroxy- β -methyl-glutarsäure und der β -Methyl-crotonsäure von RUDNEY (Lit. 13, 14) ermittelte Verteilung der ^{14}C -Aktivität war dabei in allen Punkten die nach dem Postulat erwartete.

Dass diese Säuren im Zusammenhang mit dem Aufbau der Polyisoprenoide stehen, ergaben Versuche an Ratten, wo markierte β -Methyl-crotonsäure und β -Hydroxy- β -methyl-glutarsäure nach Verfütterung in Cholesterin eingebaut wurden, ohne vorher im Gleichgewicht mit Essigsäure gestanden zu haben (BLOCH, Lit. 15).

Die Beteiligung von Coenzym A an der Steroidsynthese (Lit. 16), die sowohl in Hefe als auch in Leberpräparaten eindeutig nachgewiesen wurde, bestätigt schliesslich die Annahme, dass sie über die „aktivierten“ und nicht die freien Säuren verläuft. Zu der Frage, welche der genannten Säuren dem eigentlichen Baustein der Polyisoprenoide am nächsten steht und welche chemische Struktur dieser besitzt, ist jedoch noch keine Auskunft zu geben. In jüngster Zeit wird nach Arbeiten von FOLKERS et al. (Lit. 17, 18) auch β, δ -Dihydroxy- β -methyl-valeriansäure („Mevalonsäure“) in Betracht gezogen, welche in Lactobacillus Acetat als Wachstoffsstoff ersetzen kann und in Rattenleber nahezu quantitativ in Cholesterin eingebaut wird (Lit. 19). Aus ihrer Struktur lässt sich wenigstens formell eine nahe Verwandtschaft zu β -Hydroxy- β -methyl-glutarsäure ableiten.

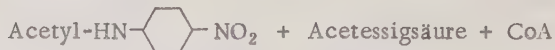
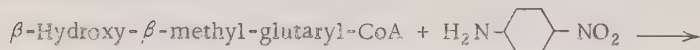
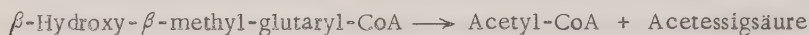
Einen näheren Einblick in Reaktionen, welche die am β -C-Atom verzweigten Säuren untereinander und mit Acetyl-Coenzym A verknüpfen, vermittelten Untersuchungen über den Abbau der Aminosäure Leucin. Wie der Arbeitskreis um COON (Lit. 20) 1954 fand, wird die bei der Oxydation von Leucin entstehende Isovaleriansäure über ihren Coenzym A-Thiolester in folgenden Schritten in Acetessigsäure und Acetyl-Coenzym A übergeführt:



Der Prozess, der im wesentlichen die Umkehr der Synthese der verzweigten Säuren nach dem hypothetischen Schema von LYNEN darstellt, wird von Enzymen katalysiert, die in Extrakten aus Herz und Leber gefunden wurden. Mit Hilfe der synthetischen Coenzym A-Thiolester konnten die Reaktionen im einzelnen festgestellt werden. Zunächst erfolgt wie beim Abbau der geradkettigen Carbonsäuren im Fettsäurecyclus eine Dehydrierung des gesättigten Coenzym A-Derivats zu β -Methyl-crotonyl-Coenzym A durch Flavoproteine, dann eine von Crotonase katalysierte Wasseraddition zu β -Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A. Anders als im Fettsäurecyclus — die OH-Gruppe ist an ein tertiäres C-Atom gebunden und deshalb nicht dehydrierbar — folgt nun die neuartige CO_2 -Fixierung, die mit der Spaltung einer energiereichen Pyrophosphatbindung verknüpft ist. Durch eine aldolase-ähnliche Spaltung entstehen dann aus β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA die Endprodukte Acetessigsäure und Acetyl-CoA, die in die bekannten Intermediärstoffwechselprozesse einmünden. Ob eine Umkehrung der letzten Reaktion für den Aufbau der verzweigten Säuren eine Rolle spielt, ist nach neuesten Untersuchungen unwahrscheinlich. Wie RUDNEY (Lit. 21) u. DECKER (Lit. 22) fanden, kann β -Hydroxy- β -methyl-glutarsäure in der Leber und in der Hefe durch Kondensation von Acetyl-Coenzym A mit Acetacetyl-Coenzym A gebildet werden, wie es das Postulat von LYNEN vorsieht. Auch die Decarboxylierung von der Stufe der C_6 -Säure zu der der C_5 -Säure scheint nach Isotopenversuchen mit Leberpräparaten auf einem anderen Weg zu erfolgen als die CO_2 -Fixierung (Lit. 23).

Eine eingehendere Untersuchung erfuhren in den letzten Jahren die Umwandlungen des β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym A. BACHHAWAT, ROBINSON u. COON (Lit. 24) beschrieben die partielle Reinigung des diese Verbindung spaltenden Enzyms aus Schweineherz, wobei die Bestimmung der gebildeten Acetessigsäure als Testgrundlage diente. Das Enzym, „HMG-CoA cleavage enzyme“ benannt, benötigt Mg- oder Mn-Ionen sowie SH-Verbindungen zur Entfaltung maximaler Aktivität und ist gegen die entsprechenden Thiolester mit Glutathion, Cystein oder N-Acetyl-cysteamin anstelle von Coenzym A inaktiv.

In zeitlicher Parallele zu diesen Arbeiten standen eigene Versuche über die Spaltungsreaktion (Lit. 25). Sie wurde hier in einem zusammengesetzten optischen Test verfolgt, der auf der Kombination der Spaltungsreaktion mit der Acetylierung von p-Nitroanilin (Lit. 26) durch die Arylamin-acetylase der Taubenleber beruht:



Das Enzym, das in verschiedenen tierischen Organen enthalten ist und in der intakten Leberzelle strukturgebunden vorliegt, wurde aus Ochsenleber partiell angereichert. Es wirkt stereospezifisch, da es von den zwei isomeren Formen von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym A, die sich in der Konfiguration des 3-C-Atoms des Säurerests unterscheiden, nur eine Form spaltet. Die Konstante des Enzym-Substrat-Komplexes wurde zu $5 \cdot 10^{-6}$ ermittelt, das pH-Optimum der Enzymaktivität zu 8.4.

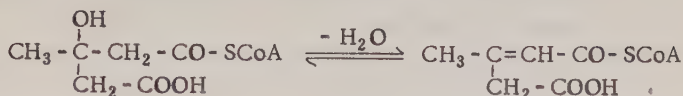
Über die Gleichgewichtslage der Spaltungsreaktion sind noch keine experimentellen Angaben vorhanden. Die Parallele zu der Reaktion



deren Konstante bei $3 \cdot 10^3$ liegt (Lit. 29), deutet jedoch auf eine weitgehende Spaltung des Substrats.

Ebenfalls mit einer optischen Methode wurde die reversible Dehydratisierung von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl- zu β -Methyl-glutaconyl-Coenzym A ...

mit tierischen und pflanzlichen Extrakten nachgewiesen.



Die Anreicherung des Katalysators aus Schafsleber führte zu der Entdeckung, dass er nicht mit der Crotonase des Fettsäurecyclus und der verzweigten C₅-Säuren identisch ist, sondern eine spezifische Enoyl-hydratase darstellt (HILZ Lit. 27). Ein Beispiel für die Bedeutung des Enzyms wird die vorliegende Arbeit aufzeigen.

Es wurde mir die Aufgabe gestellt, die Versuche über die enzymatischen Reaktionen von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym A fortzuführen und seine interessante Bildung durch die CO₂-Fixierung an β -Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A näher zu untersuchen. Dieser Aufgabenstellung lag auch der Gedanke zugrunde, die Möglichkeit einer Synthese von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym A aus Acetyl-Coenzym A und Acetessigsäure zu prüfen, wenn es gelang, die Verbindung durch eine Decarboxylierung zu Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A aus dem Gleichgewicht zu ziehen.

Zu dem Zeitpunkt, als die Versuche aufgenommen wurden, lagen von COON bereits folgende Befunde vor:

- 1) Der Übergang von C₅- zu C₆-Säure findet am β -Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A statt und führt direkt zum β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym A. Dass CO₂ nicht an eine der reaktiveren Methylgruppen von β -Methylcrotonyl-Coenzym A fixiert wird, war mit Hilfe eines Herzextrakts, der durch kurzes Erhitzen von Crotonase befreit war, eindeutig festgelegt worden: das Präparat katalysierte die Umwandlung von β -Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A in Acetessigsäure, die des ungesättigten Derivats erst nach Zugabe von Crotonase (Lit. 20).
- 2) Die Carboxylierung verläuft nur in Gegenwart von Adenosin-triphosphat, das eine Spaltung in Adenosin-monophosphat und Pyrophosphat erfährt (Lit. 28).
- 3) Herzpräparate vermögen aus Adenosin-triphosphat in Gegenwart von HCO₃⁻ Pyrophosphat abzuspalten, eine Reaktion, die durch Zugabe von β -Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A gefördert wird. Diese Tatsachen führten zu der Annahme, dass die Carboxylierungsreaktion in zwei Stufen verläuft: a) Überführung von CO₂ in eine aktivierte Form, möglicherweise Adenyl-carbonat; b) Übertragung des „aktivierten CO₂“ auf β -Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A.

Erklärung der benützten Abkürzungen:

ATP	= Adenosin-triphosphat
ADP	= Adenosin-diphosphat
AMP	= Adenosin-monophosphat
AMP-CO ₂	= Adenyl-carbonat
CoA, CoASH	= Coenzym A
Acyl-CoA	= S-Acyl-Coenzym A
HIV-CoA	= β -Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A
HMG-CoA	= β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym A
MC-CoA	= β -Methyl-crotonyl-Coenzym A
DPN ⁺	= Diphosphopyridin-nucleotid
DPNH	= reduziertes Diphosphopyridin-nucleotid
P _{ortho}	= Orthophosphat
PP	= Pyrophosphat
Trilon B	= Äthylendiamin-tetraacetat
Tris/HCl	= Puffer aus Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und HCl

I. DIE ENZYMATISCHE CARBOXYLIERUNG VON β -HYDROXY-ISOVALERYL-COENZYM A

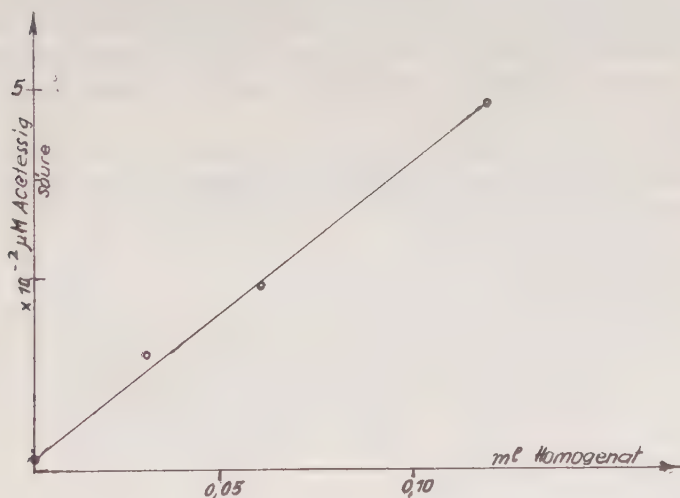
1. Nachweis der Reaktion

a) Enzymtest

Beim Arbeiten mit rohen Zellextrakten, die HMG-CoA spaltendes Enzym (im folgenden als (HMG-CoA-)Desmolase bezeichnet) enthalten, ist die Carboxylierung von HIV-CoA zwangsläufig mit der Spaltungsreaktion von HMG-CoA verknüpft. Wir benutzten daher zum Nachweis und zur Aktivitätsbestimmung des carboxylierenden Enzymsystems die Bestimmung der aus HIV-CoA, ATP und CO_2 gebildeten Acetyl-CoA- oder Acetessigsäuremenge.

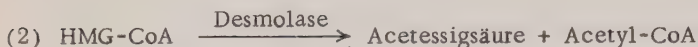
Acetessigsäure wurde mit der kolorimetrischen Methode von WALKER (Lit. 33) gemessen. Die Zusammensetzung der Enzymansätze ist bei den einzelnen Versuchen angegeben. Fig. 1 zeigt die Geschwindigkeit der Acetessigsäurebildung in Abhängigkeit von der Enzymmenge.

Fig. 1: Acetacetatbildung (Enzymabhängigkeit)



100 μM Tris/HCl pH 8.1; 10 μM MgCl_2 ; 100 μM KHCO_3 ; 7 μM Cystein;
4 μM ATP; 0.4 μM HIV-CoA; Leberhomogenat (46 mg/ml).
Vol. = 0.9 ml; Inkubation: 30 min (37°).

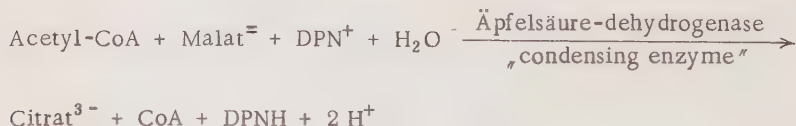
Für Routinemessungen der Enzymaktivität diene die Bestimmung von Acetyl-CoA im zusammengesetzten optischen Test. Der Gesamtvorgang besteht aus folgenden Schritten:



Die Reaktion wird durch das Verschwinden der p-Nitroanilinfarbe bei 405 mμ verfolgt. In Gegenwart eines Überschusses an Acetylase und Desmolase wird ihre Geschwindigkeit von der Teilreaktion (1) bestimmt. Die Ausführung des Tests ist in Fig. 2 wiedergegeben. Wie zu erwarten, setzt die Extinktionsabnahme mit einer Induktionsperiode ein, in deren Verlauf sich der Stationärzustand der Kette einstellt; nach etwa 5 Minuten wird die Geschwindigkeit dann konstant. Als Mass für die Aktivität des carboxylierenden Enzymsystems wurde die Extinktionsabnahme zwischen der 5. und 15. Minute gewählt und als Enzymeinheit diejenige Menge definiert, die $\Delta E = 0.001$ verursacht. Die spezifische Aktivität von Enzympräparaten ist entsprechend in Enzymeinheiten pro mg Protein ausgedrückt. Direkte Proportionalität zwischen ΔE und Enzymmenge besteht bis zu einem Wert von ≈ 0.100 (Fig. 3).

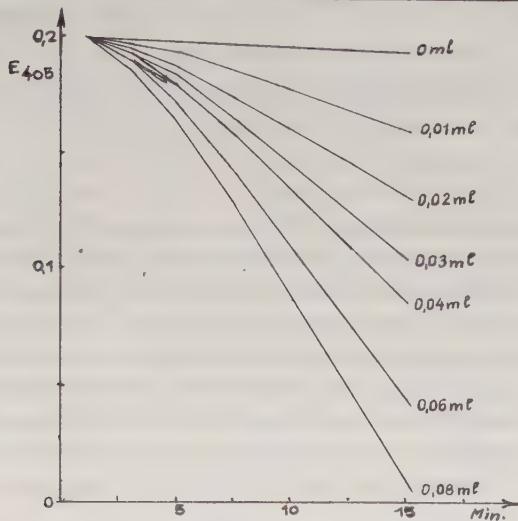
Mit der gleichen Versuchsanordnung von HMG-CoA ausgehend (Schritte 2 und 3) wurde die Aktivität der Desmolase gemessen; die Testausführung ist im Versuchsteil beschrieben. Als Enzymeinheit ist die Menge definiert, die $\Delta E = 0.001$ zwischen 3. und 8. Minute verursacht.

Eine andere Testmöglichkeit ist die Kopplung der Acetyl-CoA-Bildung mit der Äpfelsäuredehydrierungs- und Citratkondensationsreaktion (Lit. 29):



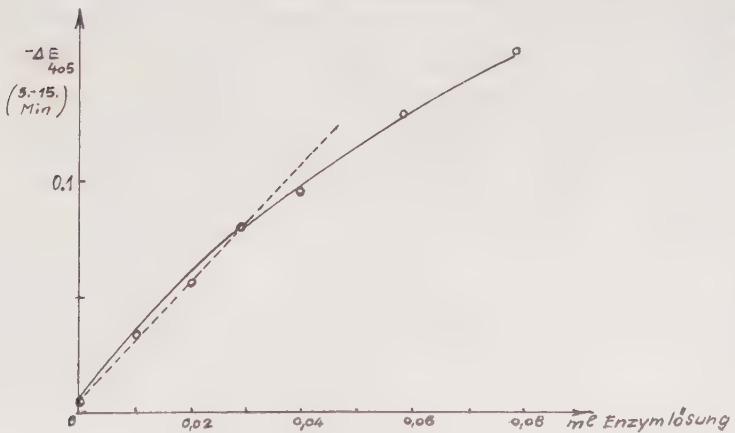
Eine hierauf gegründete Bestimmung der Desmolase ist in Abschnitt II beschrieben. Auch die Carboxylierungsreaktion konnte auf diese Weise nachgewiesen werden. Wegen störender Nebenreaktionen kam aber eine Verwendung zur quantitativen Enzymbestimmung nicht in Frage.

Fig. 2 Der zusammengesetzte p-Nitroanilintest (Kinetik)



200 μM Tris/HCl pH 8.1; 10 μM Thioglykolat; 0.15 μM p-Nitroanilin;
 16 μM MgCl_2 ; 100 μM KHCO_3 ; 1 μM ATP; 0.15 μM HIV-CoA;
 80 Einh. Arylaminacetylase; 0.5 mg Desmolasepräparat; angegebene
 Mengen Carboxylasepräparat (Fraktion AS II₂ aus Mycobacterium spp.,
 0.62 mg/ml).
 Vol. = 1.65 ml; d = 1 cm; T = 22°; λ = 405 m μ .

Fig. 3 Enzymabhängigkeit



Wenn nicht anders vermerkt, wird im folgenden für das carboxylierende Enzymsystem die Bezeichnung "Carboxylase" verwendet; unabhängig davon, dass der Ausdruck dem CO₂-fixierenden Enzym vorbehalten sein muss, wenn die Zusammensetzung des Systems aus mehreren Komponenten festgestellt werden sollte.

b) Substrate

Die Darstellung der S-Acyl-Coenzym A-Verbindungen erfolgte nach den allgemeinen Richtlinien von SIMON u. SHEMIN (Lit. 30) für die Gewinnung von Succinyl-CoA: Umsetzung von reduziertem CoA-SH in wässriger, schwach alkalischer Lösung mit entsprechenden Säure-Derivaten.

Für die Gewinnung von HIV-CoA diente als Acylierungsmittel eine Lösung des gemischten Anhydrids aus β -Hydroxy-isovaleriansäure^{†)} und Äthylkohlenensäure in Tetrahydrofuran in Analogie zur Darstellung von β -Hydroxy-butyryl-CoA nach WIELAND u. RUEFF (Lit. 31). Die Ausbeute an enzymatisch aktiver Verbindung, die anhand der Acetessigsäurebildung im Enzymansatz ermittelt wurde, betrug ca 70% bezogen auf die CoA-Menge.

HMG-CoA wurde durch Acylierung von CoA-SH mit dem inneren Anhydrid der β -Hydroxy- β -methyl-glutarsäure dargestellt. Von den entstehenden zwei diastereomeren Formen ist nur eine als Substrat der Desmolase wirksam (Lit. 25). Die Ausbeute an aktivem Thiolester, die mit der Reaktion des kombinierten p-Nitroanilin-Tests bestimmt wurde, betrug im Mittel 70% der theoretisch zu erwartenden.

Die CoA-Derivate besitzen als Thiolester die der S-Acylgruppierung zuzuschreibende Absorptionsbande im UV. Wegen der hohen Absorption des Adeninteils im Coenzym A tritt die Bande erst hervor, wenn der Thiolester mit seinem Hydrolysat verglichen wird ("Differenz-Spektrum" (Lit. 32)). Das Maximum liegt in beiden Fällen bei 236-237 m μ .

^{†)} Für die Überlassung von Hydroxyisovaleriansäure danke ich Herrn Dr. Hartmann.

2. Versuche mit Ochsenleber

a) Enzymanreicherung

Da der Arbeitskreis um COON die Carboxylierungsreaktion in Extrakten aus Herz und Leber entdeckt hatte, wurden zunächst diese Organe auf ihren Enzymgehalt geprüft. In der Fähigkeit zur Acetacetatbildung wurden verglichen ein nach den Angaben von COON²⁴ hergestellter Extrakt aus Schweineherz, sowie durch Homogenisieren mit Phosphatpuffer gewonnene Extrakte aus Schafs- und Ochsenleber. Das beste Ergebnis wurde mit Ochsenleber erhalten (Tab. 1). Eine quantitative Aussage über die Relation der Aktivitäten ist jedoch hieraus nicht möglich, da den Versuchsansätzen Cystein zugefügt worden war, das – wie erst später ermittelt wurde (vgl. Versuchsteil) – in gewissem Umfang die Bestimmung der Acetessigsäure stört.

Die Realität des Gehalts an Carboxylase war aus der Tatsache zu ersehen, dass die Bildung von Acetessigsäure vollständig von der Gegenwart von HIV-CoA und weitgehend von ATP und HCO_3^- abhängig war (Tab. 2).

Tab. 1: Acetacetatbildung mit tierischen Organextrakten

Organ	Protein (mg)	Acetessigsäure (μM)
Schweineherz	3,5	0.01
Ochsenleber	2.0	0.07
Schafsleber	10	0.02

Ansatz wie bei Fig. 1; Inkubation: 60 min (37°)

Tab. 2: Komponentenbedarf

Ansatz	Acetessigsäure (μM)
komplett	0.075
CoA statt HIV-CoA	0
ohne ATP	0.007
ohne HCO_3^-	0.021

Ansatz wie bei Fig. 1; 2.5 mg Ochsenleberhomogenat;
Inkubation: 60 min (37°)

Mit Hilfe des optischen Tests wurde ein Verfahren zur Anreicherung der Enzymaktivität aus dem Leberhomogenat ausgearbeitet. Der Trennungsgang umfasst folgende Stufen: 1. Ammonsulfat-Fraktionierung; Adsorption an $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Gel und Elution mit Ammonsulfatlösung; 2. Ammonsulfat-Fraktionierung; Alkohol-Fraktionierung in Gegenwart von Zn^{++} und Cystein. Die Gesamtausbeute beträgt um 12% bei einem Anreicherungsfaktor von ca 70 (vgl. Tab. 3).

b) Eigenschaften

Bei der Ausarbeitung des Trennungsgangs ergab sich, dass beim 3 min. Erhitzen des Homogenats auf 55° ca 90% der Enzymaktivität verloren gehen. Die grössere Beständigkeit des Enzyms bei pH 8 gegenüber pH ≤ 7 , die im Homogenat ermittelt wurde, bestätigte sich bei Versuchen, das Enzym oder seine Begleitproteine durch Fällung mit Nucleinsäuren abzutrennen; die Aktivitätsverluste betrugen hierbei um 65%. Befriedigende Ausbeuten bei Ammonsulfat-Fraktionierungen konnten aus dem nämlichen Grund nur erreicht werden, wenn ein pH 7-8 eingehalten wurde.

Auf die Gegenwart einer für die katalytische Wirkung essentiellen SH-Gruppe deutet der Einfluss von Cystein auf Präparate, die bereits partiell angereichert worden waren. Nach 14stündigem Aufbewahren eines Geleluats z.B. war die Aktivität auf 45% zurückgegangen. Durch Inkubieren des Präparats mit 0.05m Cystein bei pH 8 konnte die Ausgangsaktivität zu 95% wiederhergestellt werden. Während mit frisch bereiteten Homogenaten oder den Präparaten der 1. Ammonsulfatfällung eine Behandlung mit Cystein oder Einfluss war, ist ein solcher wiederholt mit Präparaten nach dem Gelschritt beobachtet worden.

Tab. 3: Anreicherung aus Ochsenleber (500 g)

Fraktion	Einh. $\cdot 10^{-3}$	Protein (g)	spez. Akt.	Ausbeute (%)
Homogenat	500	65	7.7	(100)
1. Ammonsulfat-fraktion (35-51%)	324	16	20	65
Eluat nach Geladsorption	200	2.8	71	40
2. Ammonsulfat-fraktion (47-58%)	118	0.89	133	23.5
	davon: 43	0.48	90	(100)
Alkoholfraktion (15-20))	24	0.045	535	56

Ein in Tab. 4 wiedergegebener Reaktivierungsversuch zeigt, dass weder eine Erhöhung von Blindläufen noch ein Einfluss auf die Aktivität der Hilfsenzyme für die beschleunigte Reaktion verantwortlich ist. Der Vorgang wird in einer Reduktion von -S-S-Bindungen am Enzym bestehen, die durch Oxydation von Sulfhydrylgruppen während des Aufarbeitungsgangs (unter der katalytischen Wirkung von Schwermetallionen) entstanden sind; oder es werden Schwermetallionen, die das Enzym hemmen, durch Komplexbildung mit Cystein entfernt.

Das angereicherte Enzympräparat enthält noch Desmolase der spezifischen Aktivität um $300 (\Delta E \cdot 10^3 / 5 \text{ min pro mg bei pH } 8)$; Carboxylase und Desmolase liegen demnach in annähernd gleicher Aktivität vor. Die Anhäufung von HMG-CoA ist mit diesem Präparat daher nicht möglich.

Da die Fraktion allein in der Lage ist, Acetessigsäure aus den Ausgangsprodukten HIV-CoA, ATP und HCO_3^- zu bilden (vgl. Abschnitt III), muss sie das Carboxylierungssystem noch vollständig enthalten. In Tab. 5 ist ein Versuch wiedergegeben, die von COON postulierte CO_2 -Aktivierungsreaktion nachzuweisen. Wie ersichtlich, war innerhalb der Fehlergrenzen keine Bildung von anorganischem Phosphat aus ATP in Abhängigkeit von HCO_3^- zu erkennen; seine Bildung war im Ansatz mit KHCO_3 sogar etwas niedriger. Auf die Carboxylierungsreaktion (gemessen in der Acetessigsäurebildung) hat Fluorid bis zur Konzentration 0.06m keinen Einfluss; vollständige Hemmung besteht bei 0.16m (Tab. 6).

Wegen des hohen ATP-ase-Gehalts sowie einiger, die Acetessigsäurebilanz störender Nebenreaktionen, konnten mit dem gewonnenen Präparat keine systematischen Untersuchungen angestellt werden.

Tab. 4: Aktivierung mit Cystein

Aktivität	$\Delta E_{5.-15. \text{ min}}$		$\Delta E/\text{min}$ (HMG-CoA)
	komplett	ohne HIV-CoA	
ohne Zusatz von Cystein	0.026	0	0.032
nach Vorinkubation mit Cystein	0.065	0	0.035
nach Zusatz von 20 μM Cystein, ohne Vorinkubation	0.035	-	-

Testansatz wie bei Fig. 2; je 0.22 mg Alkoholfraktion (0-25%). — (2. Spalte: 0.05 μM HMG-CoA statt HIV-CoA).

Vorinkubation mit 0.05m Cystein: 15 min bei pH 8 (0°).

Tab. 5: Bildung von anorganischem Phosphat aus ATP

Versuch	P _{Ortho} (μ M)	Pyrophosphat (μ M)
ohne KHCO ₃	4.2	0.2
mit	3.8	0.2

200 μ M Tris/HCl resp. KHCO₃; 100 μ M KF; 20 μ M MgCl₂;
10 μ M Cystein; 10 μ M ATP; 3.2 mg Alkoholfraktion (sp. Akt. 510);
pH = 8.1. — Vol. = 2.06 ml; Inkubation: 70 min (37°).

Tab. 6: Einfluss von Fluorid

KF (μ M)	Acetessigsäure (μ M)
0	0.10
30	0.11
100	0

60 μ M Tris/HCl pH 8.0; 40 μ M KHCO₃; 3 μ M Cystein;
5 μ M MgCl₂; 4 μ M ATP; 0.4 μ M HIV-CoA; 0.5 mg Des-
molasepräparat; 0.5 mg Desmolasepräparat; 0.5 mg Frak-
tion AS (47%58%); KF wie angegeben. Vol. = 0.6 ml;
Inkubation: 60 min (37°).

3. Versuche mit Mycobacterium spp.

Da die Carboxylierungsreaktion auf dem Abbauweg von Leucin liegt, lag der Gedanke nahe, dass Mikroorganismen, die auf dieser Verbindung als Nahrungsquelle wachsen, einen weitaus grösseren Gehalt an dem carboxylierenden Enzymsystem besitzen als z.B. Leberzellen.

In Extrakten aus Clostridium sporogenes, das anaerob auf Glucose und Leucin gezogen war, konnte mit dem optischen Test keine Aktivität gefunden werden. Eine Pseudomonas-Rohkultur, der Leucin als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle geboten wurde, lieferte dagegen einen Extrakt mit einer gegenüber Leberhomogenat ca 10fach höheren spezifischen Aktivität.

Für das Aufziehen von grösseren Bakterienmassen kam Leucin als Nahrungsquelle wegen seiner Kostspieligkeit aber nicht in Frage. Wir suchten deshalb einen Organismus, der auf Isovaleriansäure, dem wohlfeilen Abbauprodukt des Leucins, wächst. Dr. SCHLEGEL isolierte aus einer Erdprobe, die dem Wurzelbereich von *Valeriana officinalis* entstammte, einen als *Mycobacterium* spp. identifizierten Organismus, dessen Nährmedium als organische Kohlenstoffquelle Isovaleriansäure, als Stickstoffquelle NH_4Cl enthält. Im zellfreien Extrakt ist das carboxylierende Enzymsystem in einer gegenüber Leberhomogenat 40-75fach höheren Aktivität enthalten (spez. Aktivität 300-600), weshalb wir diesen Organismus im folgenden als Studienobjekt benutzten.

a) Anreicherung der Carboxylase

Die Zusammensetzung des Nährmediums, sowie technische Einzelheiten über die Gewinnung von Bakterienmassen im 30 g-Massstab werden im Versuchsteil beschrieben. Die gewaschenen Zellen wurden durch mechanisches Verreiben mit Al_2O_3 -Pulver aufgeschlossen und mit Pufferlösung extrahiert. Die Ausbeute an löslichem Protein betrug im Durchschnitt 50 mg pro 1 g feuchter Zellen.

Ein Reinigungsgang, dessen Ergebnis Tab. 7 zusammenfasst, führte durch Ausfällung von Nucleinsäuren mit Protamin und wiederholte Ammonsulfat-Fraktionierung zur ca 10fachen Anreicherung der Carboxylase.

Tab. 7: Anreicherung aus *Mycobacterium* (45 g)

Fraktion	Einh. $\cdot 10^{-3}$	Protein (g)	spez. Akt.	Ausbeute
Extrakt	925	2.50	370	(100%)
Überstand der 1. Protaminfällg.	-	1.85	-	-
Überstand der 2. Protaminfällg.	765	1.32	580	83
1. Ammonsulfat- fraktion (33-56%)	625	0.895	700	67.5
2. Ammonsulfat- fraktion (40-51%)	400	0.125	3200	43

Das gereinigte Präparat (AS II₂) enthält Desmolase der spezifischen Aktivität ca 10000, d.h. gegenüber Carboxylase in grossem Überschuss. Einige Versuche zur partiellen Abtrennung der Desmolase werden im Versuchsteil beschrieben.

Für systematische Versuche war das Präparat aber insofern von hinreichendem Reinheitsgrad, als es einige störende Reaktionen nicht mehr oder nur in sehr geringem Umfang zeigte. Die im optischen Test beobachteten Blindläufe ohne CoA-Derivat waren schon nach dem Protamin-Schritt nur mehr gering und sind hier gänzlich verschwunden. Eine andere Störung war der p-Nitroanilin-Verbrauch in Gegenwart von freiem CoA-SH anstelle des CoA-Derivats. Es wird sich dabei wahrscheinlich um die Bildung von Acetyl-CoA aus endogenem Acetat mit Hilfe der Acetat-thiokinase gehandelt haben. Die Gegenwart dieses Enzyms in der Bakterienzelle ebenso wie einer β -Hydroxy-isovalerat- und Acetacetat-thiokinase wurde nachgewiesen (vgl. Abschnitt III). Da bei der Reaktionskette des optischen Tests laufend CoA-SH und Acetacetat entstehen, mussten diese Reaktionen beachtet werden. Sie dürften bei der Aktivitätsbestimmung der Carboxylase jedoch nur unwesentlich gestört haben, da die in den ersten 15 Minuten entstehenden Mengen sehr gering sind.

Die Aktivierung von β -Hydroxy-isovaleriansäure wurde mit dem gereinigten Enzym nicht mehr geprüft, dagegen mit negativem Befund die Aktivierung von β -Methyl-crotonsäure.

b) Der Bedarf an Crotonase

Nachweis eines zweiten Enzyms:

Bereits mit dem Rohextrakt war verschiedentlich beobachtet worden, dass die Reaktionsgeschwindigkeit im optischen Test durch das Desmolasepräparat der Leber beeinflusst wurde. Insbesondere mit einem Extrakt aus gefriergetrockneten Zellen betrug der p-Nitroanilin-Verbrauch in Abwesenheit des Leberenzym nur 22% des Standardwerts, obwohl der Bakterienextrakt Desmolase im Überschuss enthielt (Tab. 8).

Die Wirkung des Leberpräparats blieb annähernd vollständig beim kurzen Erhitzen auf 55° erhalten, während seine Desmolase-Aktivität dabei zu 90% verloren ging; Erhitzen auf 100° (5 min) schädigte jedoch auch die stimulierende Wirkung. Damit war angezeigt, dass der Wirkungsfaktor 1) ein Enzym und 2) nicht identisch mit Desmolase war.

Das im folgenden als Faktor II bezeichnete neue Enzym wurde aus Ochsenleber angereichert. Als Testgrundlage diente seine stimulierende Wirkung auf den p-Nitroanilin-Verbrauch bei Gegenwart einer konstanten Menge an Acetylase und Bakterienextrakt. Letzterer war einige Tage (bei 0° aufbewahrt) stabil, so dass übereinstimmende Testbedingungen gewährleistet waren.

Tab. 8: Nachweis des 2. Wirkungsfaktors

Versuch	ΔF_{405} (5.-15.min)		$\Delta E_{405}/\text{min}$	
	ohne Desmolase	mit	ohne Desmolase	mit
komplett	0.016	0.072	-	-
ohne HIV-CoA	0	0	-	-
ohne ATP	0.002	0.003	-	-
CoA statt HIV-CoA	0.019	0.020	-	-
HMG-CoA statt HIV-CoA	-	-	0.030	0.028

Kompletter Ansatz: Reagenzien wie bei Fig. 2; 0.15 μM HIV-CoA; 3 μM ATP; 90 Einh. Acetylase; 0.35 mg Extrakt aus lyophilisierten Bakterien.— Ferner wie angegeben: 0.15 mg Desmolasepräparat; 0.1 μM CoA-SH; 0.05 μM HMG-CoA. Vol. = 1.6 ml; T = 20°.

Tab. 9: Anreicherung des Faktors II aus Leber (465 g)

Fraktion	Einh. $\cdot 10^{-6}$	Protein (g)	spez. Akt.	Ausbeute
Homogenat	20	55.5	360	(100%)
Überstand der Säurefällung	19	28.6	665	95
Acetonfraktion, (30-40 %)	18.5	7.5	2460	92.5
- nach Dialyse	11.5	-	1530	57.5
1. Ammonsulfat- fraktion. (45-85%)	7.6	2.4	3160	38
- nach Dialyse	6.2	-	2580	31
Überstand des Hitzeschrittes	6.0	1.75	3430	30
2. Ammonsulfat- fraktion. (50-65%)	3.3	0.94	3500	16.5
(65-85%)	1.7	0.35	4850	8.5

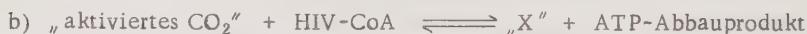
Der Trennungsgang umfasste Abtrennung von Begleitproteinen durch Nuclein-säurefällung und Hitzedenaturierung, Acetonfällung und wiederholte Ammon-sulfat-Fraktionierung (vgl. Tab. 9). Die erzielte Anreicherung betrug (ohne Berücksichtigung der Aktivitätsverluste beim Dialysieren) ca 13fach. Desmolase- und Carboxylase-Aktivität waren in dem gereinigten Präparat nicht mehr nachzuweisen.

Die Notwendigkeit des zweiten Enzyms war mit der gereinigten Carboxylase-fraktion sehr deutlich zu zeigen. Wie aus Fig. 4 und 5 ersichtlich, war die Fraktion nur mehr in geringem Mass zur Umwandlung von HIV-CoA in Acetyl-CoA und Acetessigsäure befähigt. Zur Erzielung maximaler Reaktionsgeschwindigkeit genügten aber bereits sehr geringe Mengen (um 5 %) des Faktors II.

Identifizierung:

Da das gereinigte zweite Enzym keine Desmolase enthielt, war gesichert, dass sich seine Wirkung auf eine Reaktion erstreckte, die für die Bildung von HMG-CoA aus den Ausgangsprodukten ATP, HCO_3^- und HIV-CoA notwendig war. Eine Bestätigung in dieser Hinsicht war der Befund, dass auch die Freisetzung von Phosphat aus ATP (in Gegenwart von HIV-CoA und HCO_3^-) das zweite Enzym benötigte.

Die fragliche Reaktion sollte deshalb unmittelbar mit der Aktivierung des CO_2 oder der Fixierung an das CoA-Derivat zu tun haben. Sie konnte jedoch auch zwischen der Fixierung des CO_2 und der Bildung von HMG-CoA liegen und in der Umwandlung von „X“ in HMG-CoA bestehen:

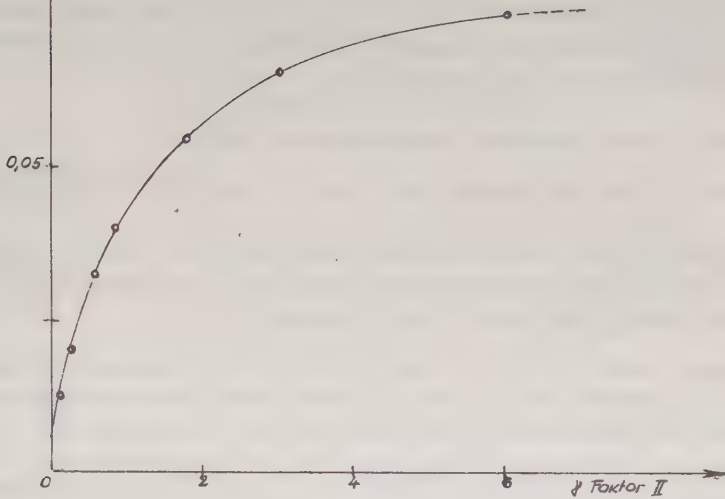


und zwar dann, wenn die Gleichgewichte der Reaktionen a) und b) soweit links lagen, dass eine merkliche Phosphatbildung erst infolge des Zuges, den c) ausübt, stattfand. Eine weitere Alternative war, dass HIV-CoA, bevor es sich mit „aktiviertem CO_2 “ umsetzte, irgendeine Veränderung erfuhr.

Über die eingangs erwähnten Arbeiten hinaus waren inzwischen weitere Mitteilungen des COONschen Arbeitskreises erschienen, die seine Vorstellungen über den Mechanismus der Carboxylierungsreaktion bestätigten. Von Schweineherz-extrakten ausgehend erzielten BACHHAWAT et al (Lit. 34) eine Auftrennung in zwei Enzymfraktionen, die nur zusammen den Carboxylierungsprozess bewerkstelligen.

$-\Delta E$
405
(5-15 Min)

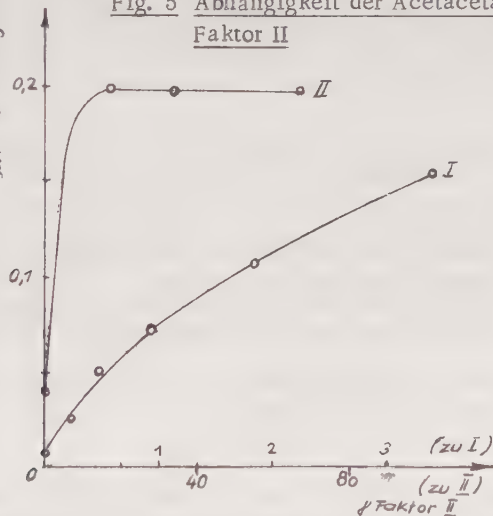
Fig. 4 Abhängigkeit der Acetyl-CoA-Bildung von Faktor II



Reagenzien wie bei Fig. 2; 80 Einh. Acetylase; 38 γ Bakterienfraktion (AS II₂); angegebene Mengen Faktor II (Fraktion AS II_C).

μM Acetessigsäure

Fig. 5 Abhängigkeit der Acetacetatbildung von Faktor II



20 μM Tris/HCl pH 8.0; 100 μM KHCO₃; 4 μM Na₂S; 10 μM MgCl₂; 4 μM ATP; 0.3 μM HIV-CoA; 0.5 mg Serumalbumin; 42 γ (I) bzw. 126 γ (II) Bakterienfraktion (AS II₂); angegebene Mengen Faktor II (Fraktion AS II_C) Vol. = 0.6 ml; Inkubation: 60 min (36°).

Durch Umsetzung des Silbersalzes der Adenylsäure mit Chlorameisensäureester erhielten sie ein Produkt, das unter der Wirkung einer der beiden Fraktionen HIV-CoA carboxylierte (gemessen an der Acetessigsäurebildung). Die andere Fraktion lieferte aus ATP in Abhängigkeit von HCO_3^- Pyrophosphat. Die Befunde stehen mit folgendem Mechanismus in Übereinstimmung:



Es war daher naheliegend, in Faktor II eines dieser Enzyme zu suchen. Versuche, mit ihm oder dem gereinigten Bakterienpräparat die CO_2 -Aktivierungsreaktion nachzuweisen, blieben aber erfolglos (vgl. Abschnitt f).

Wie eingangs erwähnt, wird die reversible Dehydratisierung von HMG-CoA zu β -Methyl-glutaconyl-CoA von der spezifischen Methylglutaconase katalysiert, während HIV-CoA ebenso wie die β -Hydroxy-Derivate geradkettiger Säuren unter der Wirkung der Crotonase Wasser abspaltet. Die Gehaltsbestimmung der fraglichen Enzympräparate an den beiden Enoyl-hydratase, die auf der Messung der Absorptionsbande α, β -ungesättigter Thiolester beruht, ergab folgendes, in Tab. 10 wiedergegebenes Bild. Sein hervorstechendes Merkmal ist die gänzlich verschiedene Verteilung der Enoyl-hydratase im Bakterienpräparat und im gereinigten Faktor II; insbesondere die Tatsache, dass Crotonase in ersterem praktisch vollständig fehlt, während Faktor II einen sehr hohen Gehalt aufweist. Es war von dieser Seite damit die Voraussetzung erfüllt, dass die Wirkung des Faktors II mit der Wirkung der Crotonase identisch war, die darin bestehen musste, HIV-CoA vor der CO_2 -Fixierung zu β -Methyl-crotonyl-CoA zu dehydratisieren:



Der unmittelbare Beweis für die Identität von Faktor II und Crotonase konnte schliesslich mit folgenden Befunden geführt werden:

- 1) Es lässt sich Faktor II unmittelbar durch kristallisierte Crotonase ⁺⁾ ersetzen;
- 2) wenn HIV-CoA durch β -Methyl-crotonyl-CoA ersetzt wird, ist die Notwendigkeit der Gegenwart von Faktor II eliminiert.

⁺⁾ Für die Überlassung von kristallisierter Crotonase danke ich Herrn Dr. Hilz.

Tab. 10: Verteilung von Crotonase und Methylglutaconase

	Crotonase spez. Akt. ⁺⁾	Methyl- glutaconase spez. Akt. ⁺⁺⁾	Crotonase Methylglutaconase
Bakterienfraktion (ASII ₂)	7.6	2300	0.003
Faktor II (ASII _C)	18000	8	2250
Desmolasepräparat der Leber	2200	192	11.5

Substrate: ⁺⁾ = HIV-CoA; ⁺⁺⁾ = HMG-CoA. Enzymtest s. Versuchsteil

Die entsprechenden Versuche mit dem kombinierten p-Nitroanilin-Test sind in Fig. 6 enthalten. Bei a) sind verglichen die Kinetik des p-Nitroanilinverbrauchs in Gegenwart von HIV-CoA und dem Präparat AS II₂: ohne Zusatz(I); mit Zusatz von Faktor II (II); mit Zusatz von kristallisierter Crotonase nach 14 Minuten (III). Bei b) wurde HIV-CoA zunächst mit Crotonase vorinkubiert, dann die Reaktion durch Zugabe von ASII₂ gestartet (IV); daneben die Reaktion von β -Methyl-crotonyl-CoA mit ASII₂ (V). In allen Fällen, wo die Möglichkeit zur raschen Bildung von β -Methyl-crotonyl-CoA gegeben ist, ist die Geschwindigkeit von der Carboxylierungsreaktion bestimmt und deshalb durchwegs gleich. Im Falle (I) dagegen wird die Geschwindigkeit von der durch die geringe Crotonasemenge bedingten langsamen Dehydratisierung von HIV-CoA bestimmt.

In Tab. 11 ist eine ähnliche Versuchsreihe, bei der die Bildung von Acetessigsäure gemessen wurde, wiedergegeben. Sie enthält das gleiche Ergebnis.

Fig. 6: Identität von Faktor II und Crotonase
(p-Nitroanilin-Test)

a)

b)

HIV-CoA

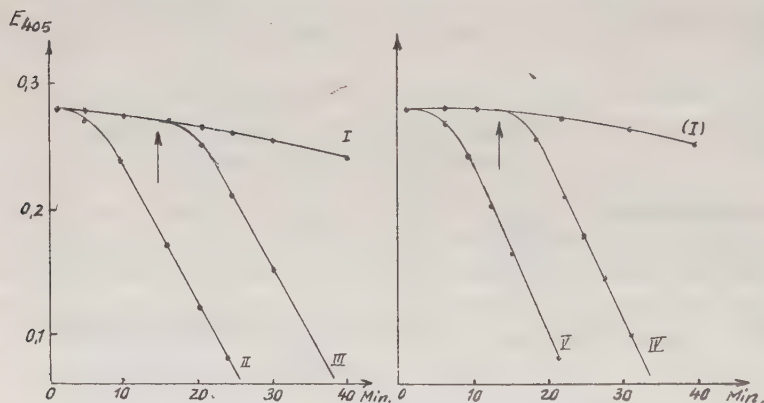
I : + As II₂

II : + As II₂ + Faktor II

III : + As II₂ + Crotonase (↑)

IV : HIV-CoA + Crotonase; + As II₂ (↑)

V : β-MC-CoA + As II₂



Reagenzien wie bei Fig. 2; 0.25 μ M HIV-CoA oder MC-CoA; 90 Einh. Acetylase. Enzyme wie angegeben: 53 γ Bakterienfraktion ASII₂; 6 γ Faktor II (ASII_C); 1.3 γ Crotonase, kristallisiert.

Tab. 11: Identität von Faktor II und Crotonase
(Acetacetatbestimmung)

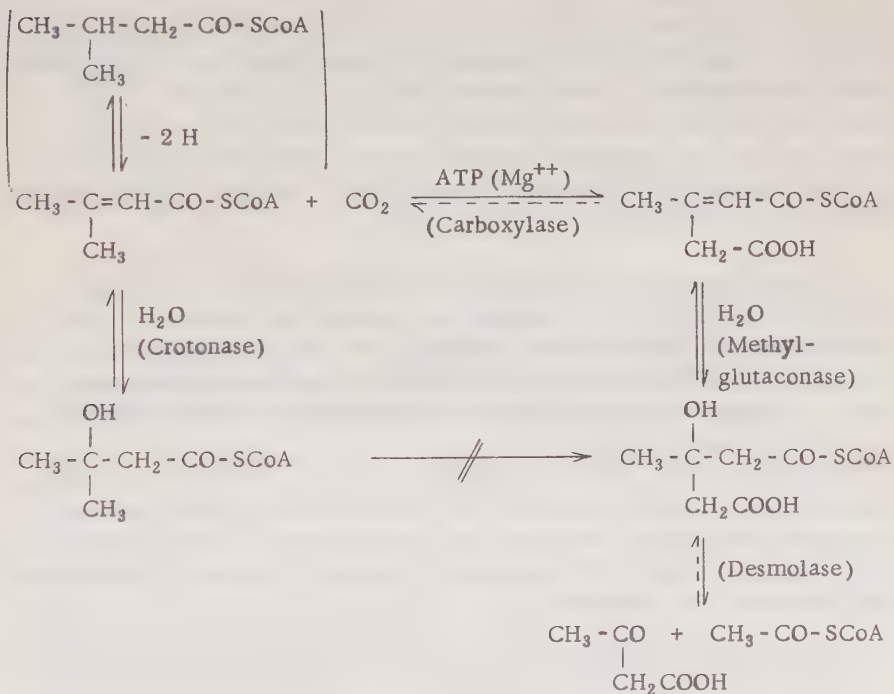
Enzyme:	ASII ₂	Faktor II	ASII ₂ + Faktor II	ASII ₂ + Crotonase	ASII ₂
Substrat:	HIV-CoA	HIV-CoA	HIV-CoA	HIV-CoA	MC-CoA
μ M Acetessigsäure	0.04	0.00	0.38	0.42	0.33

Reagenzien wie bei Fig. 5; 2.6 μ M ATP; krist.; 0.5 mg Serumalbumin. - Ferner wie angegeben: ca 0.5 μ M HIV-CoA oder MC-CoA; 66 γ Bakterienfraktion ASII₂; 6 γ Faktor II (ASII_C); 1.3 γ Crotonase. Vol. = 0.6 ml; Inkubation: 60 min (35°).

c) Der Abbauweg von Isovaleryl-Coenzym A

Mit den obigen Befunden war erwiesen, dass der Acceptor des „aktivierten CO_2 “ β -Methyl-crotonyl-CoA ist. Obwohl dies im Gegensatz zu den von COON beobachteten Verhältnissen im Herzmuskel steht, ist der Befund doch sehr einleuchtend. Denn zweifelsohne haben bezüglich ihrer Reaktivität die geminalen Methylgruppen des ungesättigten Derivats vor denen des β -Hydroxy-Derivats den Vorrang.

Für den Abbau der verzweigten Säuren im Mycobacterium ergibt sich damit folgendes Bild:



Die CO_2 -Fixierung führt zwangsläufig zu β -Methyl-glutaconyl-CoA, das dann zu HMG-CoA hydratisiert und in die C_2 - und C_4 -Stücke der „Desmolyse“ aufbricht. Eine wichtige Voraussetzung für die Richtigkeit des Schemas ist insofern erfüllt, als das Präparat ASII₂ in der Lage ist, von β -Methyl-crotonyl-CoA ausgehend die Desmolaseprodukte zu liefern (vgl. Fig. 6 und Tab. 11) und neben Carboxylase und Desmolase die erforderliche Methylglutaconase in hoher

Aktivität enthält. Obschon der endgültige Beweis erst durch die Anhäufung von β -Methyl-glutaconyl-CoA nach Entfernung der Methylglutaconase geführt werden kann, dürfte an der Richtigkeit des Schemas nicht zu zweifeln sein.

Die Tests zur Bestimmung der Carboxylase waren darauf aufgebaut, dass das Ausgangssubstrat HIV-CoA ist und der COONsche Weg eingeschlagen wird. Durch den Zusatz des Desmolasepräparats aus Leber waren jedoch immer genügend Crotonase und Methylglutaconase zugesetzt worden (vgl. Tab. 10), um zu gewährleisten, dass die Carboxylierungsreaktion auch in der um zwei Reaktionen verlängerten Kette geschwindigkeitsbestimmend war.

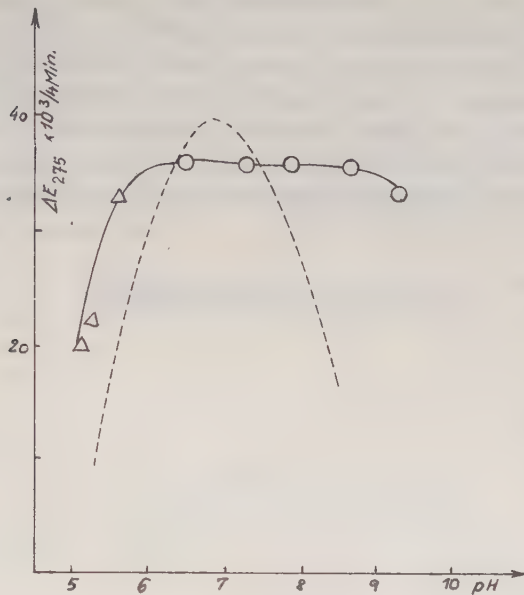
Mit dem obigen Abbauschema ist erstmals eine Funktion der Methylglutaconase aufgezeigt worden. Im rohen Bakterienextrakt ist das Enzym in einer gegenüber Schafsleberhomogenat ca 25fach höheren Aktivität (spez. Aktivität = 1280) enthalten. Während das Leberenzym ein ausgeprägtes Wirkungsoptimum bei pH 7 besitzt (Lit. 27), ist die Aktivität des Bakterienenzym zwischen pH 6.5 und 8.5 praktisch konstant (Fig. 7). Ähnliche Verhältnisse wurden bei der Untersuchung der Desmolasen gefunden (vgl. Abschnitt II).

Crotonase ist in der Bakterienzelle nur in vergleichsweise geringer Menge enthalten, wie aus der Stimulierbarkeit der Umwandlung von HIV-CoA durch Crotonasezusatz zum Rohextrakt zu entnehmen ist. Dies ist verständlich, da die Nahrungsquelle des Organismus Isovaleriansäure ist und an den ersten Stufen ihres Abbaus, die im Vergleich zu späteren Umwandlungsprozessen rasch erfolgen werden, Crotonase nicht beteiligt ist.

Wie SCHLEGEL (Lit. 35) fand, ist das Wachstum des Mycobacteriums weitgehend von der Gegenwart von CO₂ abhängig. Auf festem Nährboden z.B. konnte bei völligem CO₂-Ausschluss kein Wachstum mehr beobachtet werden. Dies deutet darauf, dass Isovaleriansäure ausschliesslich über die Carboxylierungsreaktion auf dem skizzierten Weg abgebaut wird.

Zum Nachweis der Dehydrierung von Isovaleryl-CoA wurden keine systematischen Versuche ausgeführt. Eine von Isovaleryl-CoA abhängige Hydrierung von Dichlorphenolindophenol nach dem optischen Acyl-dehydrogenase-Test von GREEN et al. (Lit. 36) konnte mit einer Ammonsulfatfraktion beobachtet werden. Die Reaktion war aber zum Teil auf die spontane Dehydrierung von CoA-SH, das aus Isovaleryl-CoA unter der Wirkung einer Deacylase gebildet wurde, zurückzuführen. In umgekehrter Richtung war die Hydrierung von Methyl-crotonyl-CoA mit Leucosafranin T als Wasserstoffdonator (Test nach SEUBERT, Lit. 37) mit dem Rohextrakt nicht nachzuweisen.

Fig. 7: pH-Abhängigkeit der Methylglutaconase-Aktivität

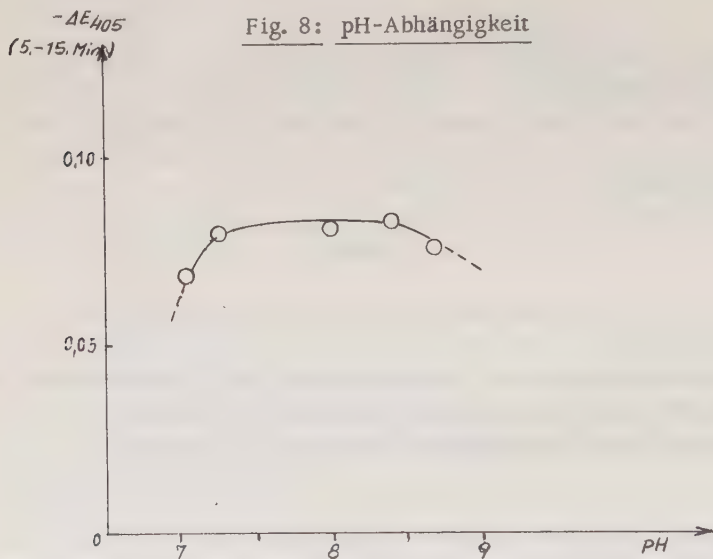


— Mycobacterium (5 γ Fraktion ASII₂); ---- Schafsleber (Lit. 27)
 Testzusammensetzung, s. Versuchsteil; ○ Tris/HCl-Puffer;
 Δ Acetatpuffer; pH-Messung nach Versuchsende (Glaselektrode).

Die Möglichkeit, dass in tierischen Geweben neben der CO₂-Fixierung an HIV-CoA auch die an Methylcrotonyl-CoA stattfindet, muss in Erwägung gezogen werden, da für die Existenz der Methylglutaconase in Leber und Herz noch keine Erklärung gefunden werden konnte. Wir versuchten, das von BACH-HAWAT (Lit. 38) beschriebene Experiment zur Identifizierung von HIV-CoA als CO₂-Acceptor zu reproduzieren. 7 mg des erhitzten und dialysierten Herzextrakts lieferten aus HIV-CoA auch in Gegenwart von kristallisierter Crotonase keine messbare Menge Acetessigsäure. Beim Hitzeschritt war neben Crotonase aber auch Desmolase zum grössten Teil entfernt worden; mit der obigen Menge wurden aus HMG-CoA bei 60 min. Inkubation (37°) nur 0.02 μM Acetessigsäure gebildet.

d) Eigenschaften der Carboxylase (Komponentenabhängigkeit)

Die Abhängigkeit der Carboxylase-Aktivität von der Wasserstoffionenkonzentration konnte mit dem optischen Test wenigstens für den Bereich von pH 7-8.5 mit Sicherheit ermittelt werden, da die Aktivität der bakteriellen Methylglutamatase (Fig. 7) und der Desmolase, sowie der Acetylase der Taubenleber (Fig. 17) in diesem Bereich weitgehend konstant ist. Überdies wurde durch die Zugabe des Desmolase-Präparats aus Leber ein weiterer Überschuss an Hilfsenzymen zugegeben. Wie aus Fig. 8 ersichtlich, besitzt auch die Carboxylase in *Mycobacterium* ein breites pH-Optimum von 7.2-8.5.



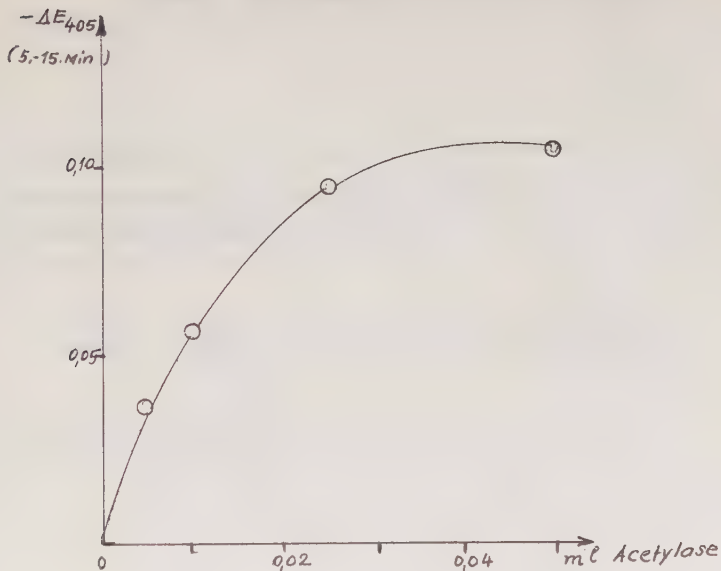
Reagenzien wie bei Fig. 2; 0.15 μ M HIV-CoA; 80 Einh. Acetylase; 0.2 mg Desmolase-Präparat; 25 γ Bakterienfraktion ASII₂. — pH-Messung nach Versuchsende (Glaselektrode).

Dass der p-Nitroanilin-Verbrauch ausschliesslich auf die Bildung und Übertragung von Acetyl-CoA zurückgeht, beweist die vollständige Abhängigkeit von Arylamin-acetylase (Fig. 9).

Aus den Abhängigkeiten der Reaktionsgeschwindigkeiten von reinem ATP und chromatographisch gereinigtem Methylcrotonyl-CoA (Fig. 10 und 11) lassen sich mit dem Verfahren von LINEWEAVER u. BURK (Lit. 39) die entsprechenden Michaelis-Konstanten zu $1.1 \cdot 10^{-4}$ resp. $8.5 \cdot 10^{-5}$ (Mol/l) ermitteln.

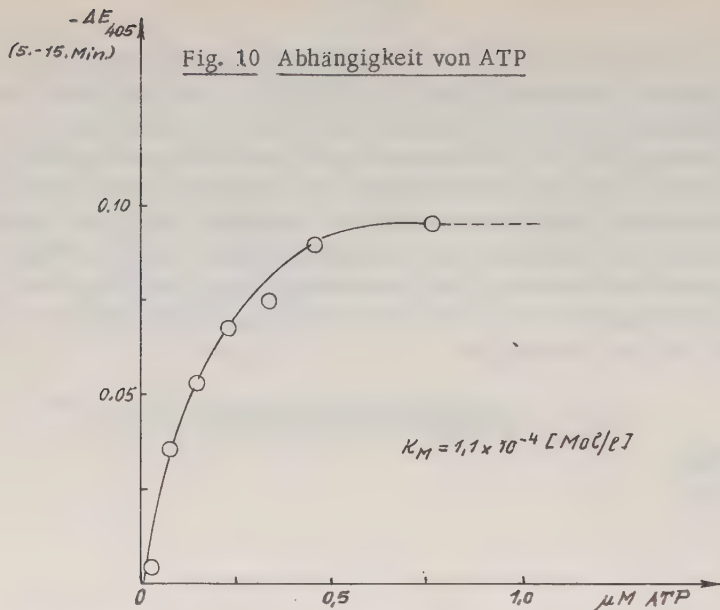
Um den Bedarf der Carboxylase an Mg-Ionen festzustellen, musste die Abhängigkeit der Desmolase-Aktivität von diesem Ion berücksichtigt werden. Wie aus Fig. 12 zu entnehmen, ist die Affinität der Desmolase im Mycobacterium (Fraktion ASI₂) zu Mg⁺⁺ aber so hoch, dass die Mg-Menge in den verwendeten Lösungen ausreichte, um ohne weiteren Zusatz ca 52% des Enzyms in das aktive Metallprotein überzuführen. Im Carboxylase-Test (wo die 6fache Proteinmenge verwendet wurde) ist der Bedarf an MgSO₄ dagegen 100proz. (Fig. 13). Der flachere Anstieg der Geschwindigkeit im Bereich von 0-0.3 μ M deutet jedoch darauf hin, dass hier die maximale Zugwirkung der Desmolase-Reaktion noch nicht erreicht ist.

Fig. 9: Abhängigkeit von Arylamin-acetylase

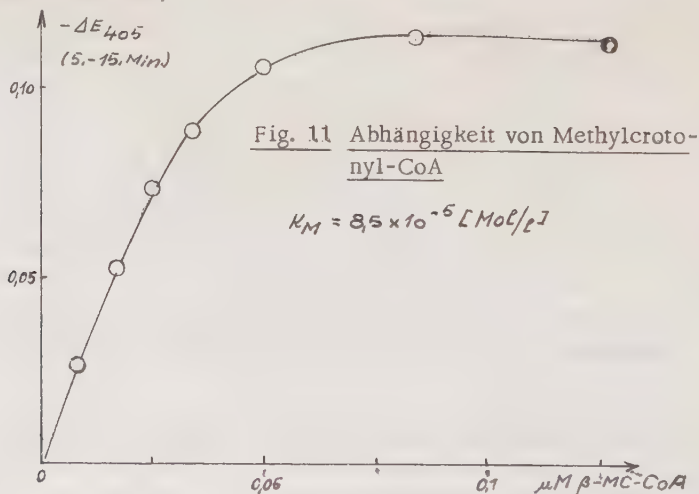


Reagenzien wie bei Fig. 2; 31 γ Bakterienfraktion ASI₂; 0.2 mg Desmolase-Präparat; angegebene Mengen Acetylase (3250 Einh. pro ml).

Von einer auffallend hohen Affinität ist die Carboxylase gegenüber Kohlen-säure. Die Tatsache war bereits bei der Verfolgung der Acetessigsäurebildung festgestellt worden, wo trotz sorgfältigen CO₂-Ausschlusses wenigstens noch 30% der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erhalten wurden. Bei den Versuchen im optischen Test wurden vorher die Reagenzlösungen frisch bereitet unter Verwendung von ausgekochtem, unter Natronasbest-Verschluss stehendem Wasser;



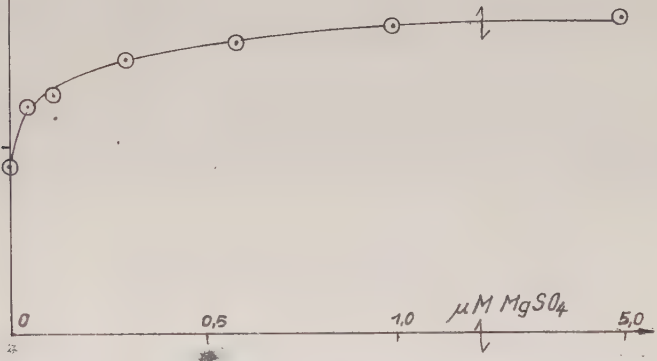
200 μM Tris/HCl pH 8.1; 3 μM Thioglykolat; 0.15 μM p-Nitroanilin;
50 μM KHCO_3 ; 5 μM MgSO_4 ; 0.1 μM MC-CoA; angegebene Mengen
ATP- $\text{Na}_2\text{H}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (krist.); 80 Einh. Acetylase; 39 γ Bakterienfraktion
AS II₂. Vol. $\approx$ 1.65 ml; T = 25°.



Reagenzien und Enzyme wie bei Fig. 10; 0.8 μM ATP (krist.); angegebene
Mengen MC-CoA (chromatographisch gereinigt).
Vol. = 1.65 ml; T = 26.5°.

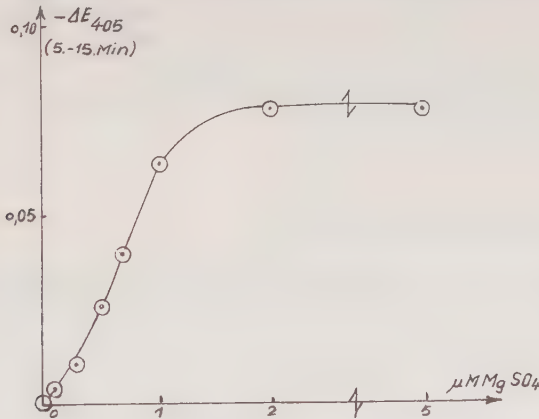
$-\Delta E_{405}$
(3-8, Min)
0,05

Fig. 12 Abhängigkeit der Desmolaseaktivität von Mg^{++}



200 μM Tris/HCl pH 8.1; 0.15 μM p-Nitroanilin; 6 μM Thioglykolat; angegebene Mengen $MgSO_4$; 0.08 μM HMG-CoA; 80 Einh. Acetylase (desmolasefrei); 6.5 γ Bakterienfraktion AS II₂.
Vol. = 1.65 ml; T = 23°.

Fig. 13 Abhängigkeit der Carboxylaseaktivität von Mg^{++}



Reagenzien wie bei Fig. 12; 0.84 μM ATP (krist.); 0.2 μM MC-CoA; 50 μM $KHCO_3$; 80 Einh. Acetylase; 39 γ Bakterienfraktion AS II₂.
Vol. = 1.65 ml; T = 23°.

die Entfernung von CO_2 aus den Enzymlösungen war dagegen nicht möglich. Ohne Zusatz von KHCO_3 betrug die Reaktionsgeschwindigkeit bei pH 8.1 noch 45%, bei pH 7.0 18,5% des Wertes mit überschüssigem KHCO_3 (Fig. 14 u. 15).

Die Michaelis-Konstanten konnten hieraus nicht ermittelt werden, da der Abhängigkeitsbereich bei pH 8 zu gering war und mangels grösserer Enzymmengen die in den Lösungen **noch enthaltene** Kohlensäure nicht bestimmt werden konnte.

Einen Hinweis, welche Form der Kohlensäure in die Reaktion eintritt, erhält man aus der Steilheit der Kurven. Bei gleicher relativer Geschwindigkeit (z.B. 45% der maximalen) muss das Enzym mit der Komponente „X“ gemäss dem Gleichgewicht

$$\frac{[\text{Enzym}] \cdot [„X“]}{[\text{Enzym-}„X“]} = K$$

in gleichem Grade gesättigt sein ($[\text{Enzym}] / [\text{Enzym-}„X“] = \text{const.}$).

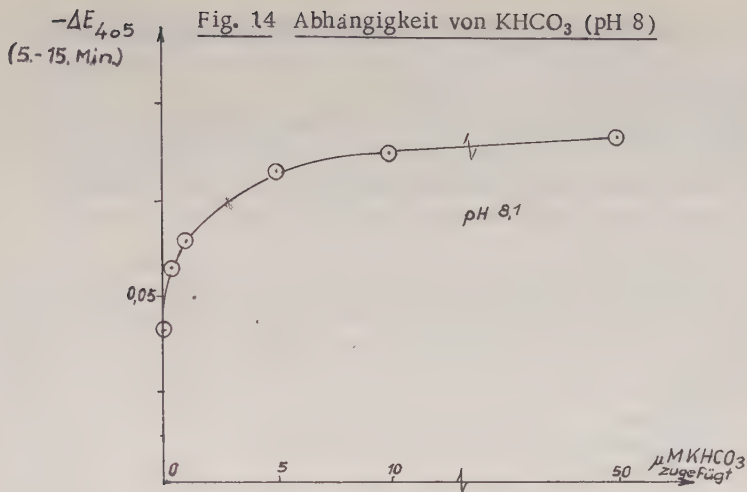
Von diesen Punkten in den Kurven ausgehend, verursacht die Zugabe von $1 \mu\text{M}$ KHCO_3 einen Anstieg der Geschwindigkeit auf 55% bei pH 7 und 70% bei pH 8. Dies lässt darauf schliessen, dass „X“ HCO_3^- (oder CO_3^{--}), nicht aber CO_2 (H_2CO_3) ist; denn bei pH 7 ist der Anteil von HCO_3^- an dem $1 \mu\text{M}$ KHCO_3 äquivalenten Gesamt- CO_2 geringer als bei pH 8.

Es sei hervorgehoben, dass die in diesem Abschnitt aufgeführten Angaben über die Komponenten-Abhängigkeiten unter der Voraussetzung ermittelt waren, dass die Carboxylierungs-Reaktion von 1 Enzym bewerkstelligt wird. Sollte sie von zwei Enzymen katalysiert werden (CO_2 -Aktivierung; CO_2 -Fixierung), sind die Angaben quantitativ nur dann richtig, wenn die betreffende Teilreaktion geschwindigkeitsbestimmend war.

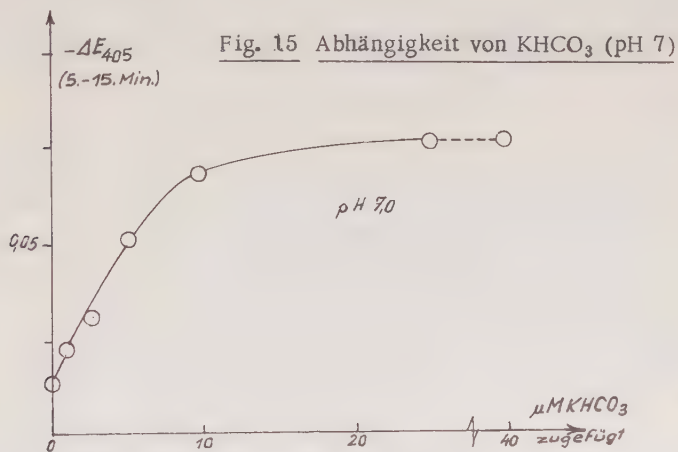
e) Bestimmung der Reaktionsprodukte

Die stöchiometrische Bildung von Acetacetat und Acetyl-CoA aus den C_5 -CoA-Derivaten wurde in der Versuchsanordnung des optischen Tests ermittelt, die sich schon bei der Bestimmung dieser Produkte aus HMG-CoA als vorteilhaft erwiesen hatte (Lit. 25). Wie damals festgestellt wurde, wird Acetyl-CoA bei 35° und pH 7 bereits merklich hydrolysiert, weshalb die Bilanz ein Defizit an Acetyl-CoA aufwies. Durch Kopplung mit der Acetylase-Reaktion werden diese und andere Störungen (Umacylierung auf zugesetzte Thiole; Deacylasenwirkung) unterbunden.

Die Ausführung des Versuchs ist in Fig. 16 wiedergegeben. Nach 24 Minuten wurde die Reaktion mit Perchlorsäure gestoppt und in der enteweißten Lösung



200 μM Tris HCl pH 8.1; 0.15 μM p-Nitroanilin; 6 μM Thioglykolat; 3 μM MgCl_2 ; 1.2 μM ATP (krist.); 0.15 μM MC-CoA; KHCO_3 wie angegeben; 80 Einh. Acetylase; 0.2 mg Desmolasepräparat; 20 γ Bakterienfraktion AS II₂. — pH nach Versuchsende: 8.1-8.15.
Vol. = 1.65 ml; T = 20°.



200 μM K-Phosphat pH 7; 15 μM MgCl_2 ; andere Reagenzien wie bei Fig. 14; 80 Einh. Acetylase; 0.3 mg Desmolasepräparat; 40 γ Bakterienfraktion AS II₂; pH nach Versuchsende: 6.95-7.0.

Fig. 16 Bestimmung von Acetyl-CoA und Acetessigsäure

Ansatz in einer Kuvette, $d = 0.5 \text{ cm}$:

100 μM Tris/HCl pH 7.3; 50 μM KHCO_3 ; 10 μM MgCl_2 ; 0.25 μM p-Nitroanilin; 2 μM Cystein; 1 μM ATP; 0.2 μM HIV-CoA; 150 Einh. Acetylase; 126 γ Bakterienfraktion AS II₂; 150 γ Faktor II. – Blindversuch: statt HIV-CoA 0.05 μM CoA (II) resp. 0.05 μM CoA und 4 μM Acetacetat (III).

Vol. = 0.905 ml; $T = 20^\circ$.

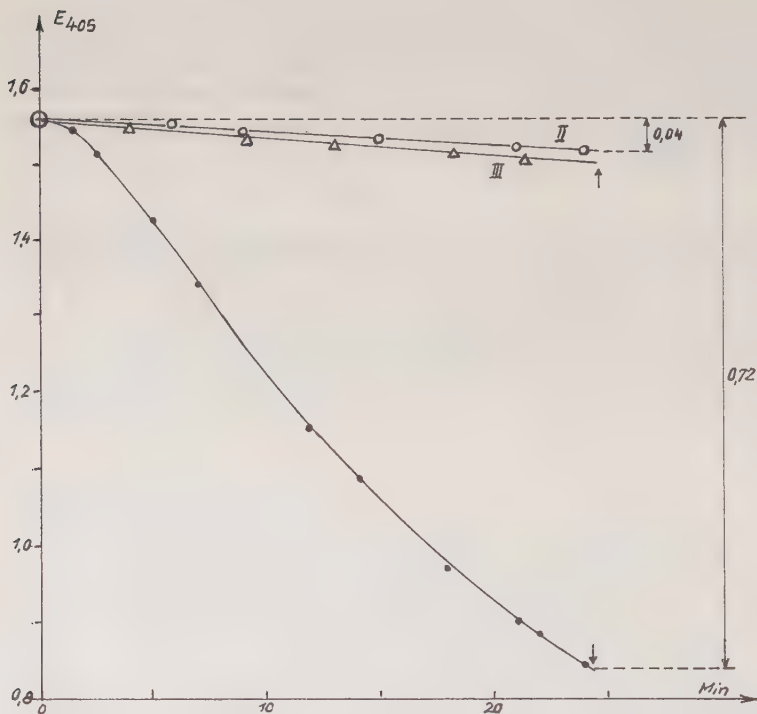
Reaktionsstop nach 24.5 min durch Zugabe von 0.4 ml 7% HClO_4 .

Bestimmung von Acetacetat gegen Blindversuch (II).

Ergebnis: $\Delta E_{\text{kor.}} = 0.720 - 0.04 \text{ (II)}$

p-Nitroacetanilid (Acetyl-CoA): 0.117 μM

Acetessigsäure: 0.124 μM



Acetessigsäure bestimmt. Der Berechnung des gebildeten p-Nitroacetanilid aus dem Extinktionsabfall wurde der molare Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{405} = 10.5 \cdot 10^3$ (Lit. 40) zugrundegelegt. Nach Korrektur um den geringen Extinktionsabfall in der Vergleichsprobe (CoA-SH statt HIV-CoA) ergab sich das Verhältnis

$$\frac{\text{Acetyl-CoA}}{\text{Acetacetat}} = \frac{0.97}{1}.$$

Bei der Analyse der Umwandlung von ATP wurde so verfahren, dass die Reaktionsprodukte des kompletten Versuchsansatzes mit denen verglichen wurden, die im Ansatz ohne HIV-CoA resp. MC-CoA entstanden waren. Damit wurde eine anderweitige Spaltung von ATP (durch ATP-ase z.B.) eliminiert und durch einen Vergleich mit der Acetessigsäurebildung der stöchiometrische Zusammenhang festgelegt. Zur Bestimmung der Produkte nach Enteiweißen der Inkubationsansätze wurden folgende Methoden herangezogen:

Orthophosphat-Bestimmung nach FISKE u. SUBBAROW (Lit. 41),

Pyrophosphat-Bestimmung nach LIPMANN et al. (Lit. 42),

Bestimmung der Adenosinphosphate mit optischen Enzymtesten ⁺⁾

(vgl. Versuchsteil).

In dem in Tab. 12 wiedergegebenen Versuch wurden alle fraglichen Produkte bestimmt. Die Gegenwart von Myokinase im Bakterienpräparat, die auf optischem Wege nachgewiesen werden konnte, verursachte mit der Reaktion



die Bildung von AMP und ADP nebeneinander. Es war daher nicht unmittelbar festzustellen, ob bei der Carboxylierungs-Reaktion primär AMP oder ADP gebildet wird. In der 2. und 3. Tabelle ist die Nucleotidbilanz unter Eliminierung der Myokinase-Reaktion für beide Fälle berechnet. Abgesehen von den Phosphatwerten nähert sich in Spalte 2) die Bilanz dem Fall, dass pro Mol Acetessigsäure 2 Mole ATP in ADP zerfallen; in Spalte 3), dass 1 Mol ATP in AMP zerfällt, wie es den Befunden COONs entspricht. Die Nucleotidwerte sind aber mit einem Fehler behaftet, da ihre Summe (-) 0.15 μM statt 0 beträgt. Das Verhältnis von Orthophosphat zu Acetacetat betrug 1.41 : 1.

Pyrophosphat war in den Ansätzen nicht nachzuweisen. Die im Bakterienpräparat vorhandene geringe Pyrophosphatase-Aktivität war andererseits nicht ausreichend, um primär gebildetes Pyrophosphat quantitativ zu Orthophosphat zu hydrolysieren.

Dass das Reaktionsprodukt Orthophosphat ist, bewiesen eindeutig die Versuche in Tab. 14. Durch den Zusatz von 0.05m KF wurde die Pyrophosphatase praktisch vollständig gehemmt, während nahezu unverändert die vom CoA-Derivat abhängige Freisetzung von Orthophosphat aus ATP und die Bildung von Acetessigsäure

⁺⁾ Für die Ausführung danke ich FrI. Dr. Schuegraf.

erfolgte. Auch war die Zugabe von kristallisierter Pyrophosphatase zum Enzymansatz ohne Einfluss (Tab. 13).

Das in mehreren Versuchen ermittelte Verhältnis von Acetacetat zu Orthophosphat schwankte zwischen den Werten 1 : 1.25 und 1 : 1.60. Es liess sich zeigen, dass die höheren Werte dann erreicht wurden, wenn zum Zeitpunkt des Abstoppens der Versuche die Reaktion noch im Gang war. Dies ist verständlich, da innerhalb der Reaktionskette die Phosphatbildung am Anfang, die Acetacetatbildung aber am Ende erfolgt. Wenn nicht ein grosser Überschuss an den Enzymen innerhalb der Kette vorliegt, kann es zu einem partiellen Anstau der Zwischenprodukte kommen und das Verhältnis Acetacetat zu Phosphat zu klein werden. Um diesen Umstand auszuschalten, wurden die Versuche so eingerichtet, dass Methylcrotonyl-CoA am Versuchsende weitgehend aufgebraucht war. Um weiterhin unkontrollierbare Nebenreaktionen zu eliminieren, wurde die Differenz aus Ansätzen mit verschiedenen Mengen des CoA-Derivats ermittelt; denn es war zu erwarten, dass die Nebenreaktionen immer mit annähernd gleicher Geschwindigkeit abliefen. Wie aus Tab. 16 ersichtlich, wurde auf diese Weise das Verhältnis gefunden:

$$\frac{\text{Orthophosphat}}{\text{Acetacetat}} = \frac{1.11}{1} .$$

Es darf daher als gesichert gelten, dass im Gegensatz zu der analogen Reaktion im Herzmuskel die Carboxylierungs-Reaktion im Mycobacterium von einer Spaltung von 1 Mol ATP in ADP und Orthophosphat begleitet ist.

Tab. 12: Phosphatbilanz (I)

120 μM Tris/HCl pH 8; 4 μM Na_2S ; 100 μM KHCO_3 ; 10 μM MgCl_2 ;
5 μM ATP (krist.); 2 μM HIV-CoA; 1 mg Serumalbumin; 0.26 mg
Bakterienfraktion ASII₂; 4 γ Crotonase (krist.).
Vol. = 1.20 ml; Inkubation: 60 min (35°).

(1): Differenz aus Ansatz mit und ohne HIV-CoA;

(2) und (3): Berechnete Werte für die Abwesenheit von Myokinase.

	ΔP_{Ortho} (μM)	ΔPP (μM)	ΔADP (μM)	ΔAMP (μM)	ΔATP (μM)	$\Delta \text{Acetacetat}$ (μM)
(1)	2.05	0	1.06	0.71	-1.92	1.45
(2)	2.05	0	2.48	0	-2.63	1.45
(3)	2.05	0	0	1.24	-1.39	1.45

Tab. 13: Einfluss von Pyrophosphatase ⁺⁾

50 μM Tris/HCl pH 8; 50 μM KHCO_3 ; 2 μM Na_2S ; 5 μM MgCl_2 ;
0.5 mg Serumalbumin; ferner wie angegeben:
44 γ Bakterienfraktion ASII_2 ; 10 γ Faktor II (ASII_C); 20 γ Pyrophosphatase (krist.); 2.5 μM ATP; 0.5 μM HIV-CoA.
Vol. = 0.60 ml; Inkubation: 60 min (36°).

Enzyme	Substrate	P_{ortho} (μM)	
		gebildet	korrigiert (+ PPase-Wert)
komplett	ATP	0.15	0.04
	ATP + HIV-CoA	0.58	0.47
ohne PPase	ATP	0.03	0.03
	ATP + HIV-CoA	0.50	0.50
ohne PPase, ohne Faktor II	ATP + HIV-CoA	0.09	0.09
Faktor II	ATP + HIV-CoA	0.00	0.00
PPase	ATP	0.11	—

Tab. 14: Einfluss von Fluorid

Reagenzien wie bei Tab. 13; 65 γ Bakterienfraktion ASII_2 ;
1.3 γ Crotonase (krist.); 30 μM KF; ferner bei 1) 2.5 μM ATP;
0.6 μM HIV-CoA; bei 2) 0.5 μM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$.
Vol. = 0.6 ml; Inkubation: 60 min (35°).

Versuch		gebildet:	
		P_{ortho} (μM) ($\pm$ HIV-CoA)	Acetacetat (μM)
(1)	ohne Fluorid	0.50	0.40
	mit Fluorid	0.52	0.39
		P_{ortho} (μM)	
(2)	ohne Fluorid	0.19	
	mit Fluorid	0.01	

⁺⁾ Für die Überlassung von kristallisierter Pyrophosphatase danke ich Herrn

Tab. 15: Einfluss des Umsetzungsgrads

Reagenzien wie bei Tab. 13; 65 γ Bakterienfraktion ASI₂; 3 μ M ATP (krist.); 0.9 μ M (bei 1) resp. 0.35 μ M (bei 2) MC-CoA.
Vol. = 0.6 ml; Inkubation: 60 min (35°).

Versuch		gebildet:		$\frac{P \text{ (} \pm \text{ MC-CoA)}}{\text{Acetacetat}}$
		P _{ortho} (μ M)	Acetacetat (μ M)	
(1)	komplett	0.81	0.48	1.60
	ohne MC-CoA	0.04	0	
	ohne ATP	0.00	0	
(2)	komplett	0.47	0.32	1.34
	ohne MC-CoA	0.04	0	

Tab. 16: Phosphatbilanz (II)

Reagenzien wie bei Tab. 13; 0.39 mg Bakterienfraktion ASI₂;
3.3 μ M ATP (krist.); 0.8 μ M (bei 1) resp. 0.4 μ M (bei 2)
MC-CoA- Vol. = 0.6 ml; Inkubation: 60 min (37°).

	gebildet:		$\frac{P_{ortho}}{\text{Acetacetat}}$
	μ M P _{ortho} Δ	μ M Acetacetat Δ	
(1)	1.32	0.79	1.11
(2)	0.90	0.41	
	} 0.42 } 0.38		

f) Der Mechanismus der Carboxylierungs-Reaktion

Die Beteiligung von ATP an der Carboxylierung von β -Methyl-crotonyl-CoA fügt diesen Vorgang zu einer Reihe von biologischen Prozessen, deren gemeinsames Charakteristikum die Synthese einer Kovalentbindung in einem Zwei-Stufen-Prozess ist:

1) Bildung eines aktiven Zwischenprodukts aus ATP und Komponente I;

2) Reaktion des Zwischenprodukts mit Komponente II.

Nach diesem Schema verlaufen folgende Reaktionen ^{+) :}

(1) Bildung von Acetyl-CoA in Hefe (BERG, Lit. 44)



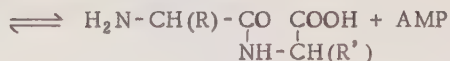
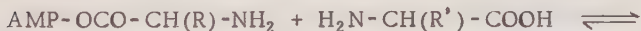
(1 Enzym)

(2) Bildung von Succinyl-CoA in E. coli (GUNSALUS, Lit. 45)

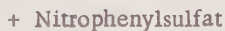


(2 Enzyme)

(3) Peptidsynthese in Leber (HOAGLAND, Lit. 46, BERG, Lit. 68)



(4) Sulfat-Fixierung in Leber (BANDURSKI, Lit. 47, LIPMANN, Lit. 48)



(3 Enzyme)

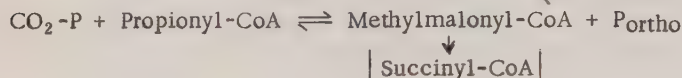
^{+) Es bedeuten: Acetyl-AMP, AMP-SO₄, ADP-CO₂ die entsprechenden Anhydride zwischen Adenosinphosphorsäure und Essigsäure, Schwefelsäure, Kohlensäure. CO₂-P: Anhydrid zwischen Phosphor- und Kohlensäure.}

(5) CO₂-Fixierung in Herzmuskel (COON, Lit. 34)



(2 Enzyme)

(6) CO₂-Fixierung in Herzmuskel (FLAVIN, OCHOA, Lit. 49, 50)

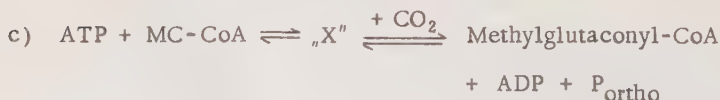


In allen Fällen liegt das Gleichgewicht der ersten Stufe weitgehend auf der Seite der Ausgangsprodukte, so dass die Existenz dieser Reaktion nicht auf direktem Wege (Bestimmung der Reaktionsprodukte) nachzuweisen war. Sie wurde angezeigt z.B. durch Isotopenversuche (Einbau von markiertem PP in ATP in Abhängigkeit von der Komponente I) im Fall (1), (3) und (4); durch den Ablauf der zweiten Reaktion mit synthetisiertem Zwischenprodukt im Fall (1), (2), (3) und (5); durch Gleichgewichtsverschiebung der ersten Reaktion, indem das Zwischenprodukt mit einer anderen Folgereaktion abgefangen wurde — im Fall (5) und (6).

In Analogie hierzu ergeben sich aus dem Gesamtvorgang

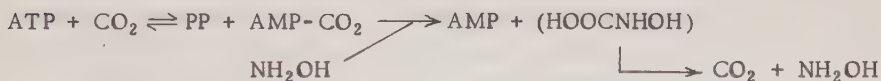


für den Verlauf der Carboxylierungsreaktion in Mycobacterium folgende Möglichkeiten:



Zu a)

Mit dem Präparat ASII₂ wurden bei Abwesenheit von β -Methyl-crotonyl-CoA nur geringe Mengen von Orthophosphat aus ATP gebildet. Sie betrugen in vielen Fällen nur 3-5% des Wertes in Gegenwart von MC-CoA. Ein Bedarf an KHCO₃ konnte dabei nie gefunden werden (Tab. 17); doch ist festzuhalten, dass die vollständige Entfernung von CO₂ aus den Reaktionsansätzen nicht möglich war. Mit dieser Einschränkung muss die Reaktion der Wirkung von ATP-ase etc. zuge-schrieben werden und nicht einer CO₂-Aktivierungsreaktion nach a). In früheren Mitteilungen (Lit. 28, 34) hatte COON zwar mit Herzextrakten die Bildung von Pyrophosphat aus ATP in Abhängigkeit von HCO₃⁻ beschrieben, mit dem gereinigten Enzym scheint jedoch keine merkliche Bildung mehr be- obachtet worden zu sein. Diese tritt erst auf, wenn den Ansätzen NH₂OH (m/15) zugesetzt wird, wodurch erreicht wird, dass das entstehende AMP-CO₂ durch eine spontane Spaltung aus dem Gleichgewicht gezogen wird (Lit. 51, 86);



Tab. 17: Phosphatbildung in Abhängigkeit von KHCO₃

Ansatz		gebildet:
		P _{ortho} (μM)
I)	mit KHCO ₃	0.13
	ohne KHCO ₃	0.13
II)	mit KHCO ₃	0.10
	ohne KHCO ₃	0.10

125 μM Tris/HCl pH 8.1; 15 μM KCl; 8 μM MgCl₂; 2 μM Glutathion;
10 μM KHCO₃; 0.5 mg Bakterienfraktion ASII₂⁺;
ferner

bei I): 2.2 μM ATP (krist.);

bei II): 0.7 μM ATP (krist.); 5 μM Phospho-enolpyruvat
; 10 γ Pyruvokinase (krist.).

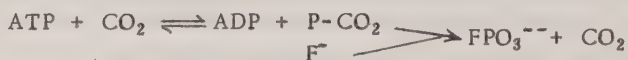
Vol. = 0.50 ml; Inkubation: 60 min (37°).

⁺ Die Enzymmenge (0.5 mg) lieferte unter gleichen Bedingungen aus MC-CoA ca 4 μM Acetacetat.

Wie in Tab. 18 gezeigt ist, hat NH_2OH auf die Bildung von Orthophosphat keinen Einfluss. Ein Aktivierungsmechanismus nach a) scheint deshalb nicht in Frage zu kommen.

Zu b)

Die hypothetische Bildung von Phosphoryl-carbonat steht in vollständiger Übereinstimmung mit der von FLAVIN et al. (Lit. 50) angenommenen CO_2 -Aktivierungsreaktion. Auf die Bildung dieses Zwischenprodukts schliessen die Autoren aus der Tatsache, dass das Propionyl-CoA carboxylierende Enzympräparat in Gegenwart von Fluorid Fluorophosphat bildet und dass diese Seitenreaktion die Synthese von Methylmalonyl-CoA verringert.



Wir haben verschiedentlich Carboxylasepräparate (und auch die Hilfsenzympräparate) auf die Fähigkeit der Fluorophosphatbildung untersucht, wobei die von FLAVIN angegebene Versuchsanordnung verwendet wurde. Seine Bildung (gemessen als „labiles Phosphat“ nach Entfernung der Nucleotide) konnte jedoch nie beobachtet werden (Tab. 19 und 20). Ausserdem zeigte Fluorid in einer Konzentration von 0.05m keinen Einfluss auf die Synthese von Acetacetat aus Methylcrotonyl-CoA.

Tab. 18: Einfluss von NH_2OH

Ansatz	gebildet:	
	P_{ortho} (μM)	PP (μM)
I) komplett	0.11	0
ohne NH_2OH	0.14	0
II) komplett	0.18	-
ohne NH_2OH , ohne KHCO_3	0.20	-

50 μM Tris/HCl pH 8; 50 μM KHCO_3 ; 5 μM MgCl_2 ; 2 μM Na_2S ;
3 μM ATP (krist.); 40 μM NH_2OH (wässrige Lsg. pH 7.8);
ferner

bei I) 0.39 mg; bei II): 0.65 mg Bakterienfraktion ASH_2^+
Vol. = 0.60 ml; Inkubation: 60 min (37°).

⁺) Enzymaktivität wie bei Tab. 17 angegeben.

Tab. 19: Nachweis der Fluorokinase-Reaktion nach FLAVIN

Kompletter Ansatz:

380 μM KHCO_3 ; 4 μM MgCl_2 ; 100 μM KF; 4 μM ATP; Enzymlösung.
Vol. = 1.50 ml. — Vor Enzymzugabe wurden die Lösungen mit CO_2 gesättigt (30°).

Ansatz „ohne CO_2 “:

N_2 statt CO_2 ; 100 μM Glycylglycin/HCl-Puffer pH 7.25 statt KHCO_3 .

„Blind“-Ansatz:

Wie kompletter Ansatz, aber ATP nach Inkubation zugefügt.

Inkubation: 30°Min. (30°) in verschlossenen Gläsern, CO_2 (N_2) als Gasphase.

Bestimmung von P_{ortho} und $\text{P}_{\text{ortho} + \text{labil}}$ nach Entfernung der Nucleotide.

Enzymlösung	Ansatz	P_{ortho} (μM)	$\text{P}_{\text{ortho} + \text{labil}}$ (μM)
Bakterien- extrakt (3.1 mg)	Blind	1.12	1.40
	Komplett	1.37	1.69
	ohne CO_2	1.34	1.68
	ohne F^-	1.57	1.77
Bakterien- fraktion, AS 0-50 (2.6 mg)	Blind	0.30	0.43
	Komplett	0.34	0.48
	ohne CO_2	0.36	0.48
	ohne F^-	0.41	0.55
Desmolase- präparat aus Leber (6.6 mg)	Blind	0.56	2.31
	Komplett	2.99	4.82
	ohne CO_2	3.13	4.85
	ohne F^-	8.13	8.33
Acetylase- präparat (2.6 mg)	Blind	0.48	0.66
	Komplett	0.50	0.69
	ohne CO_2	0.53	0.68
	ohne F^-	-	-

Anmerkung: Das Desmolasepräparat der Leber enthielt Pyrophosphat und Pyrophosphatase. Die hohen Werte im Ansatz ohne F^- sind zum grössten Teil auf die hier entfallende Hemmung der Pyrophosphatase zurückzuführen.

Es wurde weiterhin versucht, ADP durch die Pyruvokinase-Reaktion



aus dem Gleichgewicht zu ziehen, um dadurch eine Anhäufung von Phosphoryl-carbonat zu erzielen. Eine Mehrbildung von P_{ortho} in den mit Trichloressigsäure enteweissten Ansätzen — die Behandlung müsste zur Hydrolyse von $P\text{-CO}_2$ geführt haben — wurde nicht beobachtet (Tab. 17).

Da keine weiteren Versuche angestellt wurden, muss die Frage des Carboxylierungsmechanismus völlig offen bleiben. Dass eine CO_2 -Aktivierung nach a) stattfindet, ist denkbar, wenn ADP-CO_2 nicht wie AMP-CO_2 durch $m/15 \text{ NH}_2\text{OH}$ gespalten wird, und weiterhin (wie anzunehmen ist) das Gleichgewicht der Aktivierungsreaktion praktisch vollständig auf der Seite der Ausgangsprodukte liegt. Die Möglichkeit der Reaktion b) muss ebenfalls weiterhin offen gehalten werden, da z.B. nicht erwiesen ist, dass die Fluoridreaktion spontan verläuft. Wenn sie enzymatisch katalysiert ist, könnte das Ausbleiben der Reaktion in unseren Versuchen auf das Fehlen des entsprechenden Enzyms in *Mycobacterium* zurückzuführen sein. Dies ist jedoch wenig wahrscheinlich, da im Herzpräparat die Erhöhung der Fluoridkonzentration von 0.02m auf 0.1m noch eine deutliche Verstärkung der Fluorophosphatbildung hervorruft, 0.02m F^- aber bereits im Substratsättigungsbereich einer Enzymreaktion liegen dürfte.

Tab. 20: Bildung von Fluorophosphat

$50 \mu\text{M Tris/HCl pH } 8$; $50 \mu\text{M KHCO}_3$; $5 \mu\text{M MgCl}_2$; $2 \mu\text{M Na}_2\text{S}$;
 $0.5 \text{ mg Serumalbumin}$; $0.13 \text{ mg Bakterienfraktion AS II}_2^{+})$;
 $2.2 \mu\text{M ATP (krist.)}$; $45 \mu\text{M KF}$.
 Vol. = 0.6 ml ; Inkubation: $60 \text{ min } (35^\circ)$

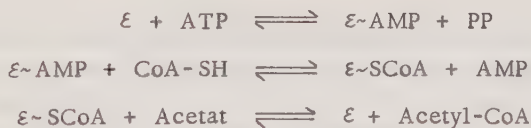
Versuch	gebildet: $P_{\text{ortho}} + \text{labil}$
mit Fluorid	$0.045 (\mu\text{M})$
ohne Fluorid	$0.053 (\mu\text{M})$

^{+) Enzymaktivität wie bei Tab. 17 angegeben.}

Ein wichtiges Moment bei der Frage, unter welchen Umständen ein Zwischenprodukt nachgewiesen werden kann, ist die nicht vorauszusehende Stärke seiner Bindung an das Enzymprotein bzw. dessen abschirmende Wirkung. Sie kann z.B. in obigen Versuchen die Spaltung durch NH_2OH oder F^- verhindert haben. Ein Beispiel hierfür bietet die von BERG (Lit. 44) eingehend untersuchte Acetataktivierung. Das Zwischenprodukt Adenylacetat kann erst durch NH_2OH in sehr hoher Konzentration (≥ 1 molar) abgefangen werden, während das Reaktionsprodukt Acetyl-CoA sehr leicht in die Hydroxamsäure übergeführt wird. Gerade bei den CO_2 -Aktivierungsreaktionen scheint eine solche Vorrichtung zum Schutz des Zwischenprodukts sehr sinnvoll zu sein, da hier die freien Zwischenprodukte zweifellos sehr leicht der spontanen Hydrolyse anheimfallen würden.

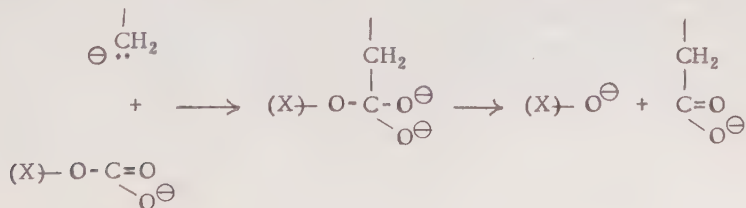
Das Beispiel der Acetat-Aktivierung lehrt weiterhin, dass ein Zwei-Stufen-Prozess der Carboxylierung nicht notwendigerweise durch zwei Enzyme katalysiert werden muss, obwohl diese in vielen Fällen dieses Reaktionstypus aufgefunden wurden. Eine auch nur partielle Auftrennung in zwei Enzymfraktionen wurde bei den Anreicherungsversuchen nicht beobachtet, doch lässt die geringe Reinigung keine Aussage zu.

Es sei schliesslich darauf hingewiesen, dass neben den genannten Möglichkeiten a) bis c) noch die denkbar ist, dass statt der Bildung eines Zwischenprodukts aus zwei Substratkomponenten ausschliesslich die Bildung energiereicher Enzym-Substrat-Zwischenverbindungen stattfindet. Als Beispiel hierfür kann die Acetat-Aktivierung nach den früheren Vorstellungen von LYNEN u. LIPMANN (Lit. 52) angeführt werden:



Ausser mit Isotopenaustauschversuchen könnte eine solche Reaktion nur anhand stöchiometrischer Enzymmengen untersucht werden.

Die Fixierung des CO_2 resp. „aktivierten CO_2 “



dürfte nur an einer bestimmten, durch die geometrische Lage zur Carboxylfunktion festgelegten Methylgruppe erfolgen. Denn es wird von den beiden cis-trans-Isomeren des Methylglutaconyl-CoA nur die für die Enoyl-hydratase spezifische Form entstehen. Wegen der Unmöglichkeit, Methyl-glutaconyl-CoA nach bekannten Methoden darzustellen (Lit. 27), konnte bislang die Spezifität der Methylglutaconase noch nicht ermittelt werden. Es sei vermerkt, dass Crotonase, obwohl ihr natürliches Substrat trans-Crotonyl-CoA ist, ebenfalls zur Hydratisierung des cis-Derivats befähigt ist (Lit. 53).

Noch völlig ungeklärt ist die Rolle des Vitamins Biotin bei allen Carboxylierungsreaktionen. Seine Bedeutung wurde auch für den Fall der Umwandlung der Isopropylgruppe des Leucins in Acetacetat festgestellt (LARDY, Lit. 54). COON (Lit. 51) konnte schliesslich zeigen, dass in der Leber biotinfrei ernährter Ratten HIV-CoA carboxylierendes Enzym fehlt, während der Gehalt an CO₂-aktivierendem Enzym (und ebenso an Desmolase) unverändert ist. Es wird vielfach angenommen, Biotin sei an der Synthese der carboxylierenden Enzyme beteiligt. Dagegen ist von LICHSTEIN (Lit. 55) im Falle der Oxalacetat-carboxylase der Leber kürzlich die unmittelbare Bindung von Biotin an das Enzymprotein wahrscheinlich gemacht worden.

II.

EIGENSCHAFTEN DES β -HYDROXY- β -METHYL-GLUTARYL-COENZYM A SPALTENDEN ENZYMS

Wie eingangs erwähnt, ist Desmolase ein Bestandteil verschiedener tierischer Organe; sie wurde nachgewiesen in Leber, Herz, Niere, Hoden, nicht dagegen im Gehirn (Lit. 25). Das Enzym ist weiterhin im Mazerationssaft von Hefe und im Mycobacterium spp. enthalten. Die in den Rohextrakten ermittelten spezifischen Aktivitäten sind in Tab. 21 zusammengestellt.

Das Verhältnis von Desmolase zu Carboxylase ist in Ochsenleber viel höher als in Mycobacterium. Es beträgt in letzterem 2-7, in Ochsenleber dagegen > 20, wenn berücksichtigt wird, dass in Phosphatpuffer bei pH 6.8 (Test a) nicht die optimale Aktivität erfasst wird (vgl. Versuchsteil und pH-Abhängigkeit in Fig. 17). Möglicherweise ist der Unterschied darauf zurückzuführen, dass der Desmolase in der Leberzelle neben dem Abbau von Leucin und der damit verknüpften verzweigten Carbonsäuren noch eine andere Aufgabe zukommt.

Tab. 21: Desmolasegehalt von rohen Zellextrakten
(spez. Aktivität)

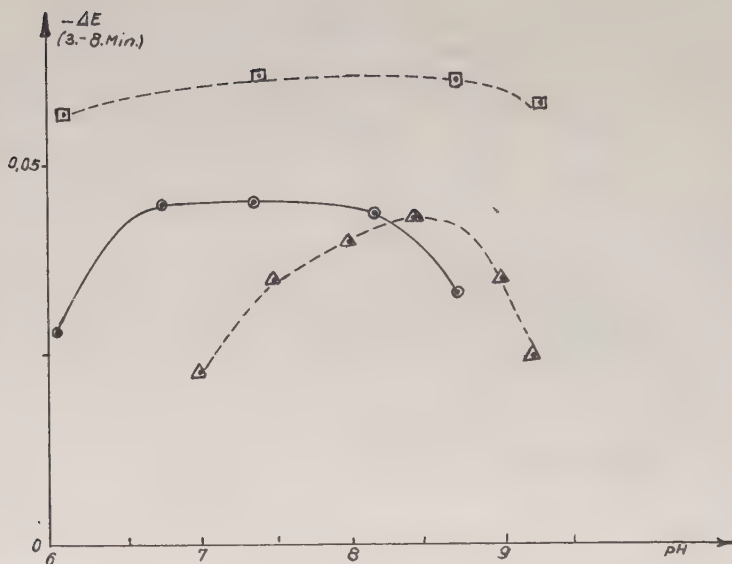
		Desmolase		Carboxylase
		Test a) ⁺⁾	Test b) ⁺⁺⁾	
	Leber	190	-	-
	Niere	125	-	-
Ratte	Herz	40	-	-
	Hoden	10	-	-
	Gehirn	0	-	-
Rind	Leber	200	-	6- 10
	Hefe			
	(Mazerationssaft)	20	-	-
	Mycobacterium	-	1300-1900	250-600

⁺⁾ Phosphatpuffer pH 6.8; ⁺⁺⁾ Tris/HCl-Puffer pH 8.

Die Abhängigkeit der katalytischen Wirkung von der Wasserstoffionen-Konzentration ist je nach Herkunft des Enzyms verschieden, ein Umstand, der auf unterschiedlichen Aufbau des Proteins schliessen lässt. Während die Aktivität des Mycobacterienzyms zwischen pH 6.8 und 8.0 praktisch konstant ist, zeigt die des Leberzyms ein Maximum bei 8.4 (Fig. 17). Für das Enzym aus Schweineherz wurde von BACHHAWAT (Lit. 24) ein Optimum bei pH 10 gefunden. Die Bestimmung der Aktivitäten konnte im zusammengesetzten p-Nitroanilin-Test ausgeführt werden, da die Aktivität der Arylamin-acetylase im untersuchten pH-Bereich praktisch konstant ist (Lit. 26).

Die Wirkung der Desmolase ist von der Gegenwart von Mg-Ionen abhängig. Der Fig. 12 ist eine sehr hohe Affinität des Bakterienzyms zu Mg^{++} zu entnehmen, da die in den Versuchsansatz eingeschleppte Menge bereits zur Halbsättigung des Proteins ausreichte. Eine ähnlich hohe Affinität zeigt das Leberenzym (Lit. 25). Nach Befunden von BACHHAWAT (Lit. 24) lässt sich beim Herzenzym Mg^{++} durch Mn^{++} ersetzen.

Fig. 17: pH-Abhängigkeit

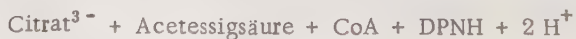
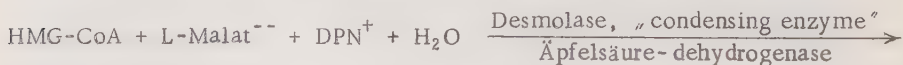


○ Bakteriendesmolase; △ Leberdesmolase; □ Acetylase ($\Delta E/\text{min}$).

Desmolase-Test b): Tris/HCl-Puffer; 50 Einh. Acetylase (desmolasefrei); 70 γ Bakterienfraktion (AS 37-45) resp. 15 γ Desmolasepräparat aus Leber.

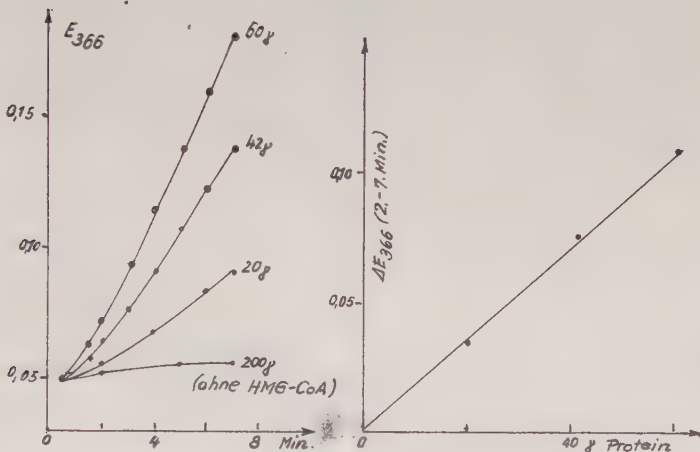
Acetylase-Test: Tris/HCl-Puffer; 300 μM Diacetyl-cysteamin. (pH-Messung nach Versuchsende mit Glaselektrode)

Im Zusammenhang mit Versuchen, die Carboxylierungsreaktion mit der optischen Bestimmung von Acetyl-CoA nach STERN et al. (Lit. 29) zu messen, erstellten wir eine Bestimmung der Desmolase nach dieser Methode. Ihre Ausführung ist in Fig. 18 wiedergegeben. Zur Messung gelangt die Geschwindigkeit der DPNH-Bildung nach dem Gesamtvorgang:



Mit dem verwendeten Leberpräparat wurde keine Beeinflussung der Aktivität durch Variation der Malatkonzentration (von 3 bis 18 $\mu\text{M}/\text{ml}$) gefunden (Tab. 22). Dagegen berichten BACHHAWAT et al. (Lit. 38) von einer partiellen Hemmung des Herzenzyms durch Malat, die bei 8.5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ bereits 54% beträgt.

Fig. 18: Zusammengesetzter DPN-Test zur Desmolasebestimmung



170 μM Tris/HCl pH 8.0; 20 μM MgCl_2 ; 10 μM Thioglykolat; 5 μM D,L-Malat; 1 μM DPN; 0.06 μM HMG-CoA; 8 γ condensing enzyme (krist.); 3.5 γ Malat-dehydrogenase (krist.); Desmolasepräparat aus Leber (wie angegeben).

Vol. = 1.70 ml; d = 2 cm; T = 20°; λ = 366 m μ (Reaktionsstart durch Desmolase) ^{†)}

Die Gegenwart von essentiellen SH-Gruppen im Desmolaseprotein wurde durch Hemmversuche mit dem spezifischen Reagens p-Chlormercuribenzoat nachgewiesen. Nach Vorinkubation mit der Hg-Verbindung wurde die Restaktivität im DPN-Test (ohne Thioglykolat) bestimmt; die Aktivität der Hilfsenzyme wurde dabei nicht wesentlich beeinflusst (vgl. Versuchsteil). Die vollständige Inaktivierung der Desmolasen trat erst bei vergleichsweise hoher Konzentration der Hg-Verbindung ein; mit dem Bakterienenzym bei $4 \cdot 10^{-4}$ m, mit dem Leberenzym bei $2 \cdot 10^{-3}$ m. Die Arylamin-acetylase wird dagegen schon von 10^{-5} m vollständig gehemmt (Lit. 26).

^{†)} Für die Überlassung von kristallisierten Präparaten von condensing enzyme und Malat-dehydrogenase danke ich Herrn Athenstaedt.

Die Inaktivierung ist reversibel; durch 0.05m Cystein liess sich die Enzymwirkung in beiden Fällen vollständig wiederherstellen.

Tab. 22: Einfluss von Malat

D,L-Malat (μ M)	$\Delta E_{2,-7. \text{Min.}}$	$\Delta E_{1,-10. \text{Min.}}$
5	0.072	0.124
10	0.069	0.121
30	0.068	0.118

Ansatz wie bei Fig. 18; 40 γ Desmolasepräparat aus Leber.

Tab. 23: Hemmung mit p-Chlormercuribenzoat (CMB)

Bakterienenzym		Leberenzym	
Endkonzentration CMB (Mol/l)	Hemmung (%)	Endkonzentration CMB (Mol/l)	Hemmung (%)
$8 \cdot 10^{-5}$	0	$6 \cdot 10^{-5}$	13
16 "	0	18 "	12
23 "	48.5	64 "	38
29 "	93.5	175 "	98
40 "	99		
58 "	100		
$40 \cdot 10^{-5}$; dann 0.06m Cystein	104% der Ausgangs- aktivität	$177 \cdot 10^{-5}$; dann 0.05m Cystein	110 % der Ausgangs- aktivität

III.

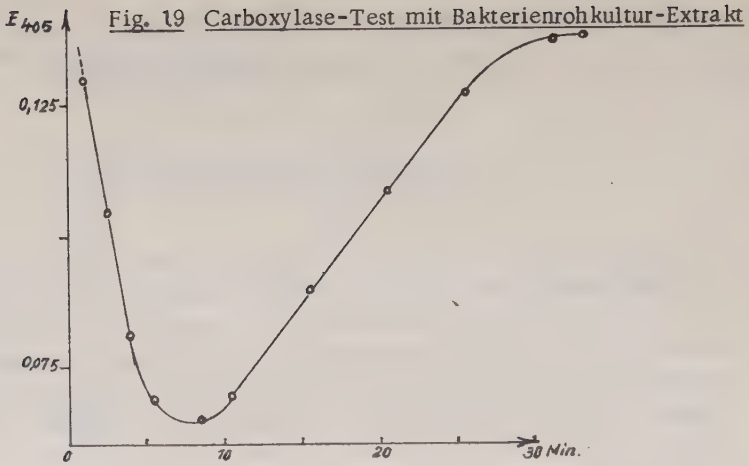
NACHWEIS EINIGER ENZYMREAKTIONEN1. Hydrolyse von p-Nitroacetanilid

Verschiedentlich waren aus einer Rohkultur Bakterienmassen auf Isovaleriansäure-Nährmedium (unter Zusatz von Hefeextrakt und Pepton) gezogen worden, die neben *Mycobacterium* noch andere, nicht identifizierte Individuen enthielten. Bei der optischen Bestimmung der Carboxylase in den hieraus gewonnenen Extrakten wurde beobachtet, dass die Extinktion bei 405 m μ anfänglich abnahm, nach 10 Minuten aber ungefähr auf den Ausgangswert zurückging (Fig. 19). Dieser Befund war am einfachsten damit zu erklären, dass gebildetes p-Nitroacetanilid zur freien Base hydrolysiert wurde.

Die Richtigkeit der Annahme ergab sich bei der Inkubation des Extrakts mit p-Nitroacetanilid, wobei die intensiv gelbe Farbe des p-Nitroanilins auftrat. Die quantitative Verfolgung bei 405 m μ zeigte, dass die Hydrolyse praktisch vollständig ist. Dass es sich um eine enzymatisch katalysierte Reaktion handelt, geht aus der Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Proteinmenge und dem vollständigen Verlust der Aktivität nach 5 min. Erhitzen des Extrakts auf 100° hervor (vgl. Fig. 20). Der höchste, einmal gefundene Umsatz betrug unter den bei Fig. 20 angegebenen Bedingungen 0,07 μ M/min pro mg Protein.

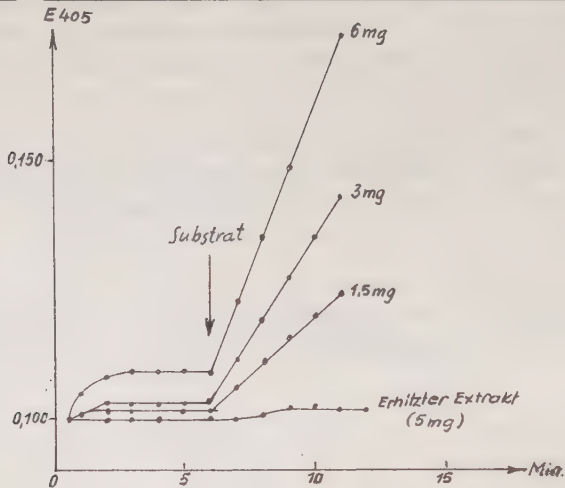
Das Enzym scheint keine Metall-Ionen zu benötigen, da Komplexbildner wie Trilon A oder Trilon B (0.01m) oder KCN (0.002m) keine Hemmung verursachen. Ohne Einfluss ist auch p-Chlormercuribenzoessäure in einer Konzentration von 10^{-4} m. Das Wirkungsoptimum liegt bei pH um 9.5.

In der Reinkultur von *Mycobacterium* spp., in *Clostridium sporogenes* und im Ochsenleberhomogenat ist das Enzym nicht enthalten. Versuche über seine Substratspezifität wurden nicht angestellt.



Ansatz des Carboxylase-Tests, Fig. 2; 6 mg Protein eines Rohkultur-Extrakts. Messung gegen Blindküvette ohne HIV-CoA.

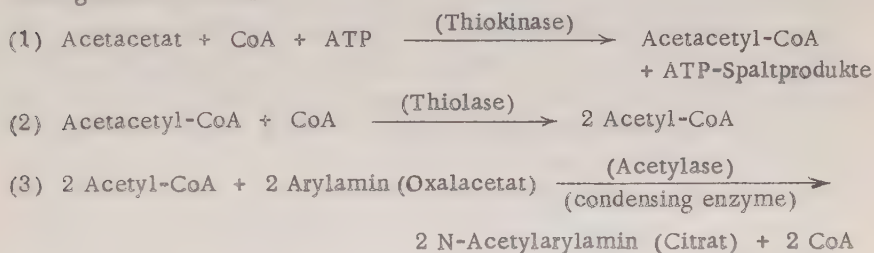
Fig. 20 Enzymabhängigkeit der Hydrolyse von p-Nitroacetanilid



0.80 ml 0.2 m Trispuffer pH 8.0; angegebene Proteinmengen eines Rohkultur-Extrakts; 0.20 ml 0.001m p-Nitroacetanilid bei ↓. — Vol. = 1.60 ml; d = 1 cm; T = 20°.

2. Aktivierung von Acetessigsäure

Die Überführung von Acetessigsäure in Acetacetyl-CoA nach dem Mechanismus der Aktivierung von Acetat und seinen Homologen wurde von STERN et al. in der Taubenleber (Lit. 56), in Schweinenieren und in Hefe (Lit. 57) nachgewiesen. In den Zellen des Herzmuskels, wo die Bildung von Acetacetyl-CoA durch die Transfer-Reaktion mit Succinyl-CoA ermöglicht ist, scheint das aktivierende Enzym nur in geringer Menge enthalten zu sein (Lit. 57). Die Reaktion wurde mit der Entstehung von Acetyl-CoA aus Acetessigsäure, CoA und ATP angezeigt, welche durch die Citratsynthese (in Gegenwart von Oxalacetat) oder durch die Acetylierung von Sulfanilamid im Falle der Taubenleber gemessen wurde.



In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte in der Taubenleber Acetacetat-thiokinase mit Hilfe der Acetylierung von p-Nitroanilin nachgewiesen werden (Fig. 21). Das verwendete Präparat enthielt neben Acetylase und Thiolase ^{†)} noch grössere Mengen Desmolase, jedoch kein Acetat-aktivierendes Enzym. Die Stöchiometrie der Reaktionsfolge (1) bis (3) geht aus einem Versuch mit HMG-CoA hervor (Fig. 21a): bei Gegenwart von ATP entstehen aus dem durch die Desmolase-Reaktion anfallenden Acetacetat zwei weitere Mole Acetyl-CoA resp. p-Nitroacetanilid.

In dem im Versuchsteil beschriebenen, gereinigten Acetylasepräparat ist Acetacetat-thiokinase nicht mehr nachzuweisen; da es aber eine hinreichende Menge Thiolase enthält, kann es vorteilhaft als Hilfsenzympräparat für die optische Bestimmung des aktivierenden Enzyms verwendet werden. Eine geringe Aktivität konnte auf diese Weise in einer Fraktion des Mycobacterienextrakts nachgewiesen werden; sie enthielt ausserdem Acetat-thiokinase.

Die Bakterienzelle besitzt weiterhin die Fähigkeit zur Aktivierung von β -Hydroxy-isovaleriansäure zu HIV-CoA, wie anhand der Bildung von Acetessigsäure festgestellt wurde (Tab. 25). Möglicherweise handelt es sich hier um die unspezifische Wirkung eines Carbonsäure-aktivierenden Enzyms. Bekanntlich besitzt z.B. die Caprylat-thiokinase der Leber auch bezüglich der Hydroxysäuren eine grosse Spezifitätsbreite (Lit. 58).

^{†)} Für den Nachweis von Acetacetyl-thiolase in verschiedenen Präparaten danke ich Herrn Dr. Hartmann.

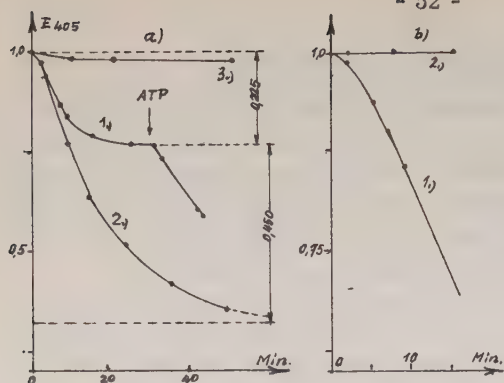


Fig. 21 Acetacetat-Aktivierung in Taubenleber

200 μM Tris/HCl pH 8; 0.15 μM p-Nitroanilin; 10 μM Thioglykolat; 16 μM $MgCl_2$; Präparat aus Taubenleber (130 Einh. Acetylase); ferner bei a) (1) 0.034 μM HMG-CoA; 5 μM ATP bei $\downarrow$,

(2) HMG-CoA und ATP,

(3) verseiftes HMG-CoA und ATP;

bei b) (1) 0.1 μM CoA; 4 μM ATP; 3.7 μM Acetacetat,

(2) CoA; ATP; 4 μM Acetat. Vol. = 1.60 ml; $T = 20^\circ$; $d = 1$ cm.

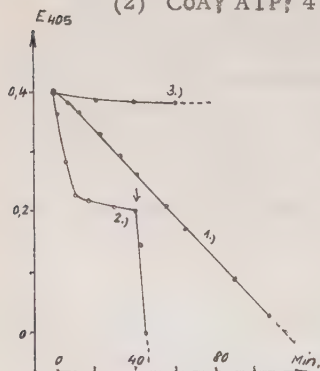


Fig. 22 Acetacetat- (und Acetat-) Aktivierung in Mycobacterium

125 μM Glycylglycin/HCl pH 7.25; 0.15 μM p-Nitroanilin; 10 μM $MgCl_2$; 5 μM Cystein; 3 μM ATP; 0.1 μM CoA; 80 Einh. Acetylase-Präparat; 1 mg Bakterienfraktion AS (35-51);

ferner:

(1) 0.6 μM Acetacetat (gemessen gegen Blindversuch ohne Acetacetat);

(2) bei $\downarrow$ 1 μM Acetat;

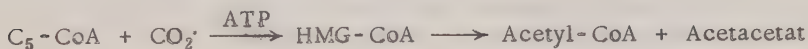
(3) 0.6 μM Acetacetat und 1 μM Acetat, jedoch ohne Bakterienfraktion.

Vol. = 1.65 ml; $d = 1$ cm; $T = 20^\circ$.

3. Befunde zur Bildung von Acetessigsäure

Bei Untersuchungen mit dem angereicherten Carboxylase-Präparat der Leber wurde folgendes festgestellt:

Die Geschwindigkeit der Acetessigsäurebildung war von HIV-CoA, ATP und HCO_3^- ausgehend grösser als mit HMG-CoA unter gleichen Bedingungen. Diese Tatsache war mit dem Ablauf der Reaktionskette



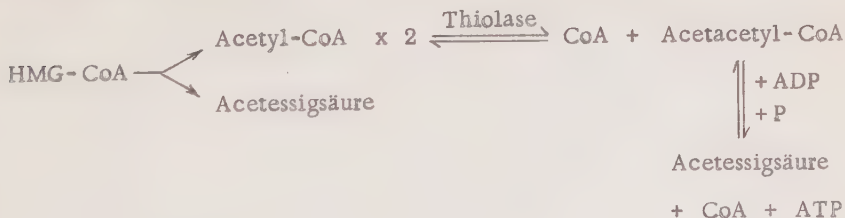
unvereinbar, da die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion nicht grösser als die der zweiten Teilreaktion sein konnte. Der Befund konnte dahingehend geklärt werden, dass aus HMG-CoA mehr Acetessigsäure gebildet wurde, wenn dem Ansatz ATP zugefügt war. Da aber die Spaltung von HMG-CoA von ATP unabhängig ist, musste es sich um eine Nebenreaktion handeln.

KHCO_3 war auf die Reaktion ohne Einfluss. Weiterhin lieferte die Inkubation mit freier Hydroxymethylglutarsäure, CoA und ATP keine Acetessigsäure, eine Aktivierung der freien Säure war damit ausgeschlossen.

Da die Ansätze Cystein enthielten, das die Bestimmung der Acetessigsäure störte, sind die Angaben in Tab. 24 nur als Relativwerte anzusehen.

Eine andere ungeklärte Bildung von Acetessigsäure wurde mit einer Fraktion aus *Mycobacterium* beobachtet. Sie erfolgte hier aus Acetyl-CoA und ATP. Wie der Tab. 25a zu entnehmen ist, liegt die Funktion des ATP nicht in der Aktivierung von Essigsäure, mit der Acetyl-CoA verunreinigt war. Eine Störung der Acetessigsäurebestimmung lag nicht vor, da unter gleichen Bedingungen inkubierte Acetessigsäure quantitativ wiedergefunden wurde.

Es ist denkbar, dass der Befund am Leber- und am Bakterienpräparat die gleiche Ursache hat. Wenn es sich nicht um eine unspezifische Beeinflussung von Reaktionsbedingungen handelt, so mag folgende Möglichkeit in Erwägung gezogen werden:



Acetyl-CoA kann zunächst zu Acetacetyl-CoA kondensieren; die Gegenwart von Thiylase in den verwendeten Präparaten wurde nachgewiesen. Nach dem von GUNSALUS (Lit. 45) für die Spaltung von Succinyl-CoA entdeckten Mechanismus könnte dann eine Deacylierung von Acetacetyl-CoA erfolgen. Das hierzu benötigte ADP könnte durch eine ATP-ase-Reaktion aus ATP entstehen, es war ausserdem in dem verwendeten ATP-Präparat als Verunreinigung enthalten.

Die Mehrbildung von Acetessigsäure aus HMG-CoA in Gegenwart von ATP wäre mit diesem Schema allerdings nicht vollständig erklärbar, da sie hiernach nur 50 % des Wertes ohne ATP betragen dürfte.

Tab. 24: Bildung von Acetessigsäure (I)

80 μM Tris/HCl pH 8.1; 80 μM KHCO_3 ; 10 μM MgCl_2 ; 10 μM Cystein; 1.2 mg Carboxylasepräparat A1 (15-20) aus Leber; ferner wie angegeben: 5 μM ATP; 1 μM HMG-säure; 0.4 μM HMG-CoA resp. HIV-CoA; 0.5 μM CoA.

Vol. = 0.8 ml; Inkubation: 60 min (37°)

Substrate	gebildet: Acetacetat (μM)
HIV-CoA, ATP	0.12
HMG-CoA	0.05
HMG-CoA, ATP	0.23
HMG-CoA, ATP (ohne KHCO_3)	0.22
HMG-säure, ATP, CoA	0
CoA, ATP	0

Tab. 25: Bildung von Acetessigsäure (II)

100 μM Tris/HCl pH 8.1; 100 μM KHCO_3 ; 10 μM MgCl_2 ;
 1 mg Bakterienfraktion AS (45-60); ferner wie angegeben:
 0.5 μM Acetyl-CoA; 0.5 μM CoA; 0.4 μM HIV-CoA;
 4 μM ATP; 2 μM Acetat; 0.125 μM Acetacetat; 1 μM HIV-Säure
 Vol. = 0.6 ml; Inkubation: 60 min (37°).

Substrate	gebildet: Acetacetat (μM)
Acetyl-CoA	0.012
a) Acetyl-CoA, ATP	0.14
Acetat, CoA, ATP	0.037
HIV-CoA, ATP	0.11
b) HIV-säure, CoA, ATP	0.087
CoA, ATP	0.002
c) Acetacetat, ATP	0.120 ⁺⁾
Acetacetat, CoA, ATP	0.118 ⁺⁾

⁺⁾ nach Inkubation noch vorhanden.

IV. THIOLESTER

1. Thiolester der β -Methyl-crotonsäure

Im Enzymansatz wurde von HILZ (Lit. 59) das Maximum der S-Acyl-Bande von β -Methyl-crotonyl-CoA (und β -Methyl-glutaconyl-CoA) bei 267 m μ ermittelt gegenüber 263 m μ bei Crotonyl-CoA (Lit. 37). Da sich weiterhin Unterschiede bezüglich der alkalischen Hydrolyse und des Differenzspektrums zeigten, wurden die Eigenschaften von S-(β -Methyl-crotonyl)-N-succinyl-cysteamin als Modellkörper des CoA-Derivats untersucht.

Das Spektrum der kristallisierten Verbindung (Schmp. 88°) zeigt Fig. 23. Wie alle α, β -ungesättigten Thiolester besitzt es zwei Banden im UV: die durch die C=C-Doppelbindung verschobene S-Acylbande bei 266 m μ und die Bande der mit der Thiolestergruppe in Konjugation stehenden C=C-Doppelbindung bei 240 m μ . Die Verschiebung der kurzwelligen Bande, die im Crotonyl-Derivat bei 225 m μ liegt, ist bereits bei den freien Säuren vorhanden.

Wie aus Tab. 26 ersichtlich, besteht bezüglich der Gestalt eine Ähnlichkeit mit dem Spektrum des Isocrotonyl-Thiolesters (Lit. 53). Man muss annehmen, dass sie in der in beiden Verbindungen gegebenen cis-Konfiguration von β -Methylgruppe und Carboxylgruppe begründet ist.

Tab. 26

	Thiolester				Säure	
	1. Bande		2. Bande		$\lambda_{\max}$ (m μ)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
	$\lambda_{\max}$ (m μ)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	$\lambda_{\max}$ (m μ)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$		
Methylcrotonyl-	240	10.1	266	11.3	208-210	9.4 ^{x)}
Isocrotonyl- ⁺⁾	240	9.3	275	10.1	212	-
Crotonyl- ⁺⁺⁾	225	10.6	263	6.5	204-205	11.1

+) nach STERN u. CAMPILLO (Lit. 53); ++) nach SEUBERT (Lit. 37, 60);

^{x)} bei $c = 5 \cdot 10^{-5}$ m (vgl. Versuchsteil)

Die Höhe der Bande bei $\lambda \geq 266$ m μ ist im direkten und im Differenzspektrum gleich ($\epsilon_{266} = 11300$), da die Hydrolyseprodukte in diesem Bereich nicht absorbieren. Unterhalb 260 m μ weicht das Differenzspektrum wegen der zunehmenden Absorption der Methylcrotonsäure im Verseifungsansatz ab (vgl. Fig. 24, Kurve 1). In Kurve 2 ist die Extinktion der äquivalenten Menge Methylcrotonsäure

addiert. Man erhält hierbei annähernd das Spektrum des Thiolesters; die Differenzen sind zum Teil auf die nicht berücksichtigte Lichtabsorption des Mercaptans bzw. des eventuell hieraus gebildeten Disulfids im Verseifungsansatz zurückzuführen.

Die Geschwindigkeitskonstanten der alkalischen Hydrolyse sind in Tab. 27 aufgeführt. Im Vergleich zum Crotonyl-Derivat, dessen Konstante bei 30° 4.23 [$\text{l} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] beträgt (Lit. 60), ist das β -Methyl-crotonyl-Derivat ausserordentlich stabil.

2. Reaktivität substituierter Thiolester

Wie bereits früher gefunden wurde, zeigen die Thiolester der β -Hydroxy- β -methyl-glutarsäure im Vergleich zu denen unsubstituierter Carbonsäuren eine bemerkenswerte Resistenz gegen Hydroxylaminolyse und Ammonolyse (Lit. 25). Zur Erhellung dieses Umstands stellten wir eine quantitative Untersuchung über die Reaktivität des Glutaryl-, β -Methyl-glutaryl- und β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Thiolesters an ^{†)}.

Die Verbindungen hatten durchwegs N-Acyl-cysteamine als Mercaptan-Komponente, so dass diesbezüglich vergleichbare Bedingungen herrschten.

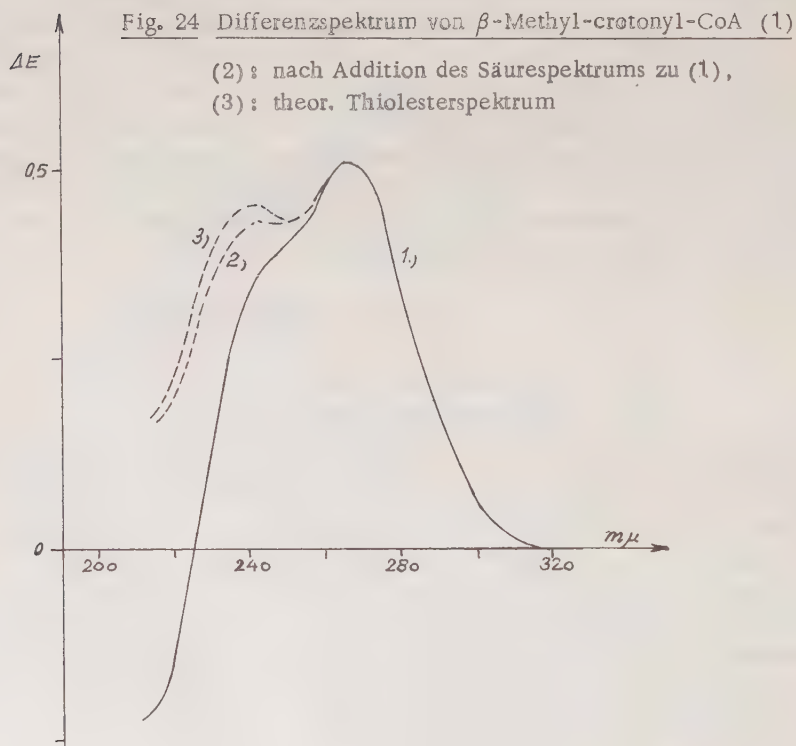
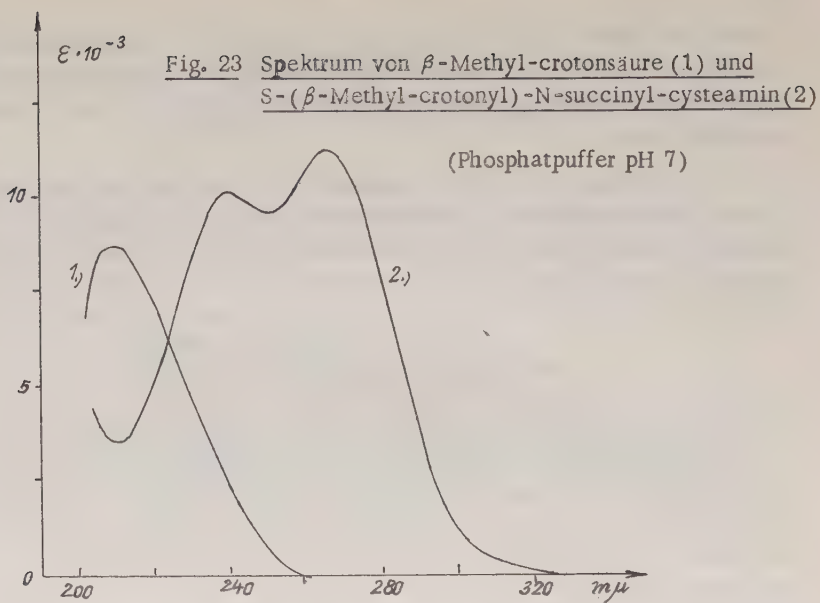
Die alkalische Hydrolyse wurde durch das Verschwinden der S-Acyl-Bande verfolgt; die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten sind in Tab. 27 zusammengefasst. Der Einfluss der β -Methyl- und der β -Hydroxy-Gruppe gleicht qualitativ dem bei Sauerstoffestern beobachteten: Erniedrigung der Reaktionsgeschwindigkeiten durch Alkyl- (Lit. 85), Erhöhung durch Hydroxy-Substitution (Lit. 61). Die Absolutwerte liegen in der Grössenordnung der für Thiolester unsubstituierter Mono- und Dicarbonsäuren angegebenen (Lit. 60, 62, 67).

Tab. 27: Alkalische Hydrolyse

k = Geschwindigkeitskonstante [$\text{l} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$],
 ΔH = Aktivierungsenergie [$\text{kcal} \cdot \text{Mol}^{-1}$]

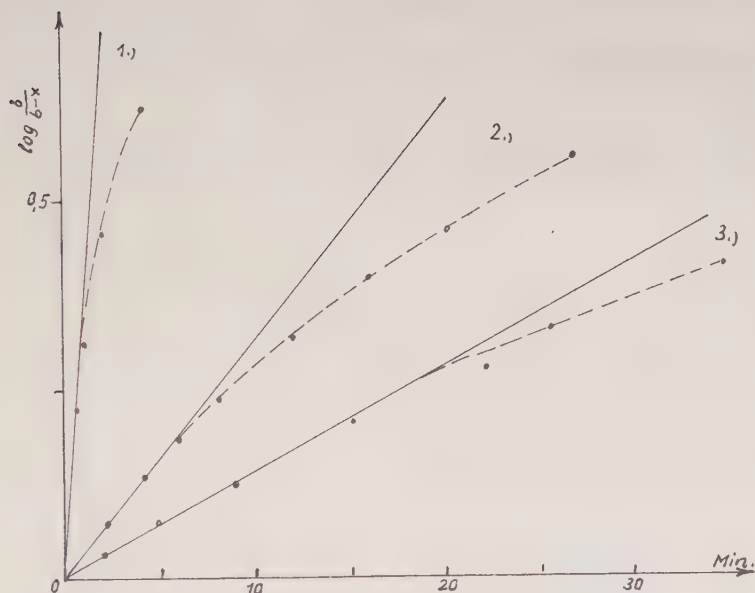
Thiolester	k_{15}°	k_{25}°	k_{35}°	ΔH
Glutaryl-	1.66 (15.0°)	3.73 (25.2°)	-	13.5
{ β -Methyl-glutaryl-	0.65 (14.9°)	1.51 (25.1°)	3.27 (35.0°)	14.1; 14.1
HMG-	0.88 ₅ (15.1°)	2.18 (25.2°)	4.65 (35.1°)	13.9; (15.0 ?)
{ β -Methyl-crotonyl-	-	0.22 ₃ (25.2°)	0.51 ₁ (35.1°)	15.1

^{†)} Für die Überlassung von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl- und Glutaryl-Thiolester danke ich Herrn Eggerer.



Die Hydroxylaminolyse wurde durch Kolorimetrieren der Fe(III)salze der gebildeten Hydroxamsäuren verfolgt. Die Umsetzung erfolgte unter den für die Thiolesterbestimmung (Lit. 63, 64) allgemein verwendeten Bedingungen (0.62m NH_2OH ; 30°). Das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten ist Fig. 25 zu entnehmen. Auch hier erniedrigt die β -Methylgruppe die Reaktivität, jedoch in viel stärkerem Masse als bei der alkalischen Hydrolyse. Weiterhin ist hier der Übergang vom β -Methyl- zum β -Hydroxy- β -methyl-Derivat mit einem weiteren Absinken der Reaktionsgeschwindigkeit verbunden.

Fig. 25: Hydroxylaminolyse (30°)

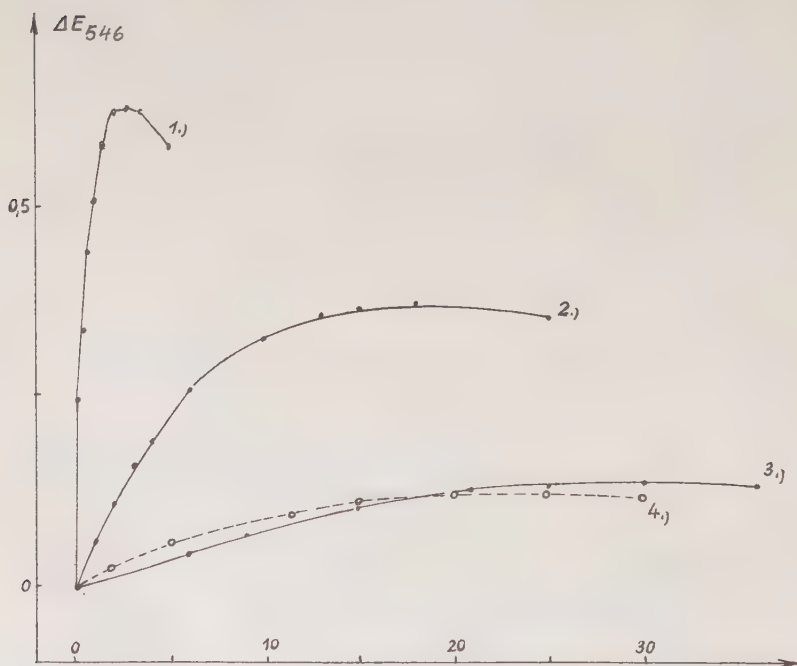


Thiolester	$\log \frac{b}{b-x} / \text{min}$	Geschwindigkeitsverhältnis
(1) Glutaryl-	0.35	100
(2) β -Methyl-glutaryl-	0.031	9
(3) HMG-	0.014	4

Das gleiche gilt für das Verhalten im verzögerten Nitroprussidtest nach LYNEN (Lit. 65). Die Kinetik der Farbentwicklung ist in Fig. 26 gezeigt. Wenn die von der Menge praktisch unabhängigen Zeiten bis zur Erreichung des halben Scheitelwertes als reziprokes Mass der Reaktionsgeschwindigkeit angesehen werden, ergibt sich ein ähnliches Verhältnis wie bei der Hydroxylaminolyse. Diese Parallelität sowie der Unterschied zu den Verhältnissen bei der Hydrolyse mit NaOH zeigen deutlich, dass im S-Acyl-Test nach LYNEN die Spaltung der Thiolester durch NH_3 (Ammonolyse) und nicht durch OH' erfolgt. Die molaren Extinktionswerte der verwendeten Thiolkomponenten im Nitroprussidtest nach GRUNERT u. PHILLIPS (Lit. 66) stimmen weitgehend überein. Im „verzögerten Nitroprussidtest“ ist die molare Extinktion des Scheitelwertes wegen der Instabilität der Farbe aber um so höher, je schneller das Mercaptan freigesetzt wird.

Die Reaktionsgeschwindigkeit des β -Hydroxy-isovaleryl-Derivats liegt in der Größenordnung des analog substituierten HMG-Derivats.

Fig. 26: Kinetik der „verzögerten Nitroprussid-Reaktion“ (24°)
(je 0.45 μM Thiolester)



Thiolester	$t_{0.5}$ (min)	$1/t_{0.5}$	Geschwindigkeits- verhältnis
(1) Glutaryl-	0.5	2	100
(2) Methylglutaryl-	4	0.25	12
(3) HMG-	9	0.11	5
(4) HIV-	6	0.17	8

EXPERIMENTELLER TEIL

L. Die optischen Enzymbestimmungen

1. Carboxylase-Test

Die Zusammensetzung ist bei Fig. 2 angegeben. Rohe Enzymlösungen verursachen eine Extinktionsabnahme auch ohne C_5 -CoA, weshalb in diesen Fällen gegen eine Vergleichsküvette ohne CoA-Derivat gemessen wurde. Bei Präparaten ohne Blindlauf wurde zur Kompensation der hohen Absorption gegen eine Vergleichsküvette mit p-Nitroanilinlösung gemessen.

Von dem Hilfsenzym Arylamin-acetylase wurden stets 80 Einheiten (vgl. S. 71) des gereinigten Präparats eingesetzt. Als Desmolasepräparat wurden 0.2-0.5 mg der dialysierten Fraktion aus Ochsenleber verwendet. Die eingesetzte Aktivität war stets so hoch, dass bei den in Fig. 2 angegebenen Bedingungen mit HMG-CoA (anstelle von C_5 -CoA und ATP) eine anfängliche Extinktionsabnahme von 0.03-0.04/min auftrat.

2. Desmolase-Test

Es wurden folgende Testzusammensetzungen verwendet:

a) 300 μ M	K-phosphat pH 6.8	b) 200 μ M	Tris/HCl pH 8.1
20	MgCl ₂	16	MgCl ₂
10	Thioglykolat	10	Thioglykolat
0.17	p-Nitroanilin	0.15	p-Nitroanilin
0.05	HMG-CoA	0.04	HMG-CoA
50 Einh.	Acetylase	50 Einh.	Acetylase
	Enzymlösung		Enzymlösung

Vol. = 2.00 ml; d = 1 cm; T = 20°

Vol. = 1.65 ml; d = 1 cm; T = 20°

Die jeweils verwendete Zusammensetzung ist in den entsprechenden Abbildungen mit a) oder b) vermerkt. In beiden Fällen wurde als 1 Enzymeinheit diejenige Menge definiert, die $-\Delta E_{405}$ (3.-8. Min.) = 0.001 verursacht. Direkte Proportionalität besteht bis zu ΔE = 0.04 bis 0.05. Die spezifische Aktivität ist in Einheiten pro mg Protein angegeben.

Test a) wurde wie früher bei der Anreicherung der Desmolase aus Leber benutzt. Bei sonst gleichen Bedingungen ist die Aktivität in Phosphatpuffer aber geringer als in Trispuffer (Lit. 25):

	$\Delta E_{405}/5 \text{ min}$
Tris pH 6.8	0.035
K-phosphat pH 6.8	0.018

Wir haben die Aktivität in dieser Arbeit deshalb meistens nach Test b) gemessen.

3. Bestimmung der Enoylhydratasen

Der Test basiert auf der Erfassung der Absorptionsbande α, β -ungesättigter Thiolester. Die Bestimmungen wurden in Anlehnung an die Vorschrift von STERN (Lit. 69) für Crotonase zusammengesetzt:

a) Methylglutaconase

0.10 ml Testmischung
0.15 μM HMG-CoA
Enzymlösung

b) Crotonase

0.10 ml Testmischung
0.1 μM HIV-CoA
Enzymlösung

Vol. = 1.0 ml; d = 0.5 cm;
T = 20°; λ = 275 m μ .

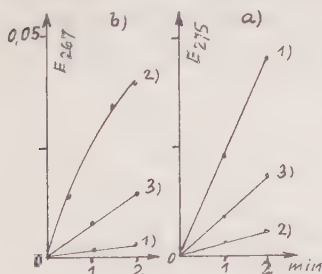
Vol. = 1.0 ml; d = 0.5 cm;
T = 20°; λ = 267 m μ .

Testmischung:

1 ml enthält 330 μM Tris/HCl pH 7.5, 50 μM Trilon B, 0.3 mg Serumalbumin.
— Zur messtechnischen Erleichterung wird die hohe Absorption der CoA-Derivate mit einer Vergleichsküvette, die AMP-Lösung enthält, kompensiert.

Der Methylglutaconase-Test wurde ausserhalb des bei 267-8 m μ liegenden Maximums ausgeführt; der ϵ -Wert liegt hier etwa 10% tiefer.

Als 1 Enzymeinheit ist in beiden Fällen die Menge definiert, die in der 1. Minute nach Reaktionsstart $\Delta E/\text{min} = 0.001$ bewirkt; spezifische Aktivität: Einheiten/mg Protein.

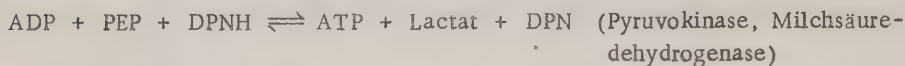
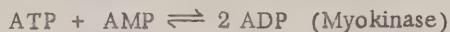


Enzymlösungen:

- 1) Bakt.-Fraktion AS II₂
10 γ (a); 198 γ (b)
- 2) Faktor II (AS II_C)
310 γ (a); 1.4 γ (b)
- 3) Leberdesmolase-Präp.
47 γ (a); 3.4 γ (b)

4. Nachweis der Myokinase

Zum Nachweis des Enzyms in der Bakterienfraktion AS II₂ wurde die für die Bestimmung von AMP angegebene optische Methode verwendet (Lit. 83):



Das Verschwinden der DPNH-Bande wurde bei 366 mμ verfolgt.

Versuchsansätze:

90 μM Triäthanolamin/HCl-Puffer pH 7.6

40 μM MgSO₄

160 μM KCl;

ferner wie angegeben: 0.3 μM DPNH (enzymatisch reduziert)

1 μM Phosphoenolpyruvat (PEP)

0.05 μM ATP (krist.)

1 μM AMP

25 γ Milchsäuredehydrogenase (MDH), krist.

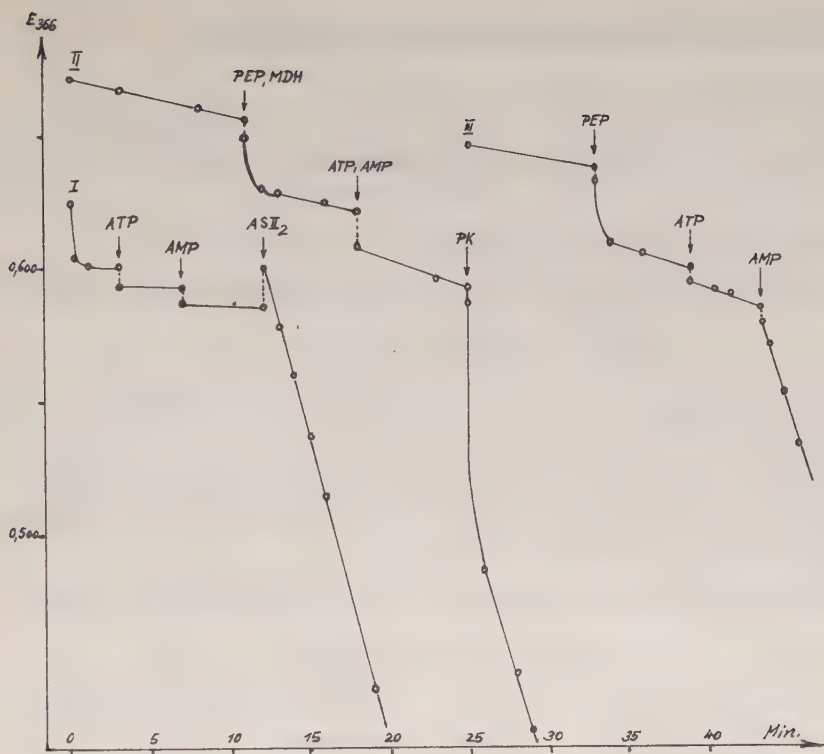
40 γ Pyruvokinase (PK), krist.

0.2 mg Bakterienfraktion AS II₂

Vol. = 1.9 ml; d = 1 cm; T = 20°.

Ergebnis: (s. Figur S. 65)

Die verwendeten Nucleotide sind frei von ADP, die Hilfsenzyme enthalten keine Myokinase (I); der kurze Abfall bei Zusatz von Phosphoenolpyruvat ist auf dessen Verunreinigung mit Pyruvat zurückzuführen. Die durch AS II₂ verursachte DPNH-Abnahme ist nur zum Teil auf eine DPNH-Oxydase zurückzuführen (II). ADP entsteht nicht durch die Wirkung von ATP-ase; die Reaktion kann mit AMP gestartet werden (III), womit die Gegenwart von Myokinase erwiesen ist.



Die Ansätze enthielten zu Beginn:

I) PK; MDH;
DPNH; PEP;

II) AsI_2 ;
DPNH;

III) PK; MDH;
 AsI_2 ;
DPNH;

5. Nachweis von Isovaleryl-CoA-dehydrogenase und -deacylase

a) Dehydrogenase-Test nach GREEN et al. (Lit. 36):

90 μM K-phosphat pH 7.0; ca 0.1 μM 2,6-Dichlorphenolindophenol;

0.06 μM Isovaleryl-CoA; 0.4 mg Bakterienfraktion AS (45-55).

Vol. = 1.62 ml; d = 1 cm; T = 20°; λ = 578 m μ .

(1): komplett; (2): ohne Isovaleryl-CoA; (3): ohne Enzym.

Berechnung der Menge, die in 5 Minuten hydriert werden ($\epsilon_{578} = 16.6 \cdot 10^3$):

$$\frac{0.088}{0.166} 1.62 \cdot 10^{-2}; = \underline{0.0086 \mu\text{M}}$$

b) Deacylierung (Verschwinden der S-Acyl-Bande):

130 μM K-phosphat pH 7.0; 0.09 μM Isovaleryl-CoA; 0.4 mg Bakterien-

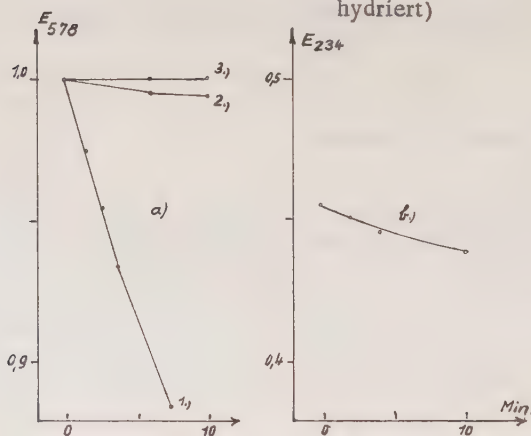
fraktion AS (45-55). Vol. = 2.07 ml; d = 0.5 cm; T = 20°; λ = 234 m μ .

(Messung gegen Blindküvette ohne Enzym).

Berechnung der Menge, die in 5 Min. deacyliert werden ($\epsilon_{234} \approx 4400$):

$$\frac{0.011}{4.4 \cdot 0.5} 2.07; = \underline{0.01 \mu\text{M}}$$

(entspricht 0.005 μM Indophenol hydriert)



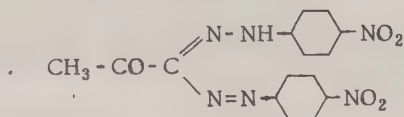
Ergebnis:

Die beobachtete Hydrierung von Dichlorphenolindophenol ist zu 40% auf eine enzymatische Dehydrierung von Isovaleryl-CoA zurückzuführen; zu 60% auf die spontane Dehydrierung von CoA-SH, das durch enzymatische Deacylierung entsteht.

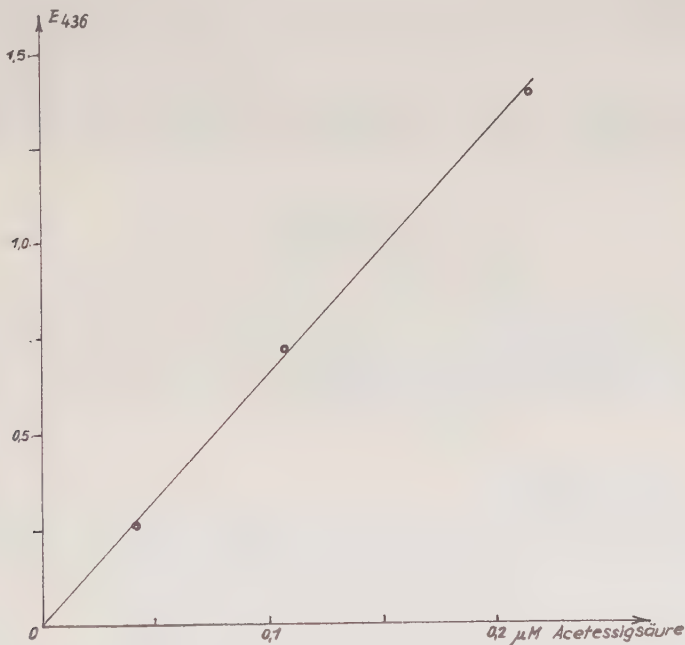
II. Bestimmung der Reaktionsprodukte

1. Acetessigsäure

Acetessigsäure wurde nach der Methode von WALKER (Lit. 33) gemessen. Sie beruht auf der Bildung des Formazans



mit p-Nitrophenyldiazoniumsalzen bei pH 5, das in Essigesterlösung kolorimetriert wurde. Die Eichkurve wurde für $\lambda = 436 \text{ m}\mu$ aufgenommen. Als Standard diente eine Acetessigsäurelösung, die nach LJUNGGREN (Lit. 70) aus konstant siedendem Acetessigester dargestellt und mit der manometrischen Methode von EDSON (Lit. 71) kalibriert wurde.



Bestimmung in Versuchsansätzen

Nach Inkubation wurden die Proben in ein Eisbad gestellt und durch Zugabe von Trichloressigsäure zur Endkonzentration 6% enteiwesst (z.B. 0.60 ml Lösung + 0.15 ml 30% Trichloressigsäure). Aliquote Teile der klaren überstehenden Lösung wurden mit dem gleichen Volumen 2m Na-acetat versetzt (End-pH 5) und mit 1m Acetatpuffer (pH 5.15) auf 1 ml aufgefüllt; dann, wie beschrieben, mit Diazoniumsalzlösung versetzt und aufgearbeitet.

Die erhaltenen Werte wurden korrigiert um den Wert eines Blindversuchs, der alle Substanzen enthielt und zur Zeit 0 gestoppt wurde.

Das Volumen vor Zugabe der Diazoniumsalzlösung kann von 1 ml auf 2 ml erhöht werden, ohne dass ein Fehler von $> 2\%$ auftritt.

Störungen der Bestimmung

1) Von 0.1 μM Acetessigsäure werden nach 1 Stunde Inkubation bei 37° und pH 7-8 (Tris- oder Phosphatpuffer) sowie Ansäuern mit Trichloressigsäure 97-100% wiedergefunden.

Bei Inkubation mit Glycylglycin-puffer pH 7.25 werden unter gleichen Bedingungen nur 45% erhalten.

2) Die Bildung des Formazans stören SH-Verbindungen wie Cystein, Glutathion, HS^- in einer Konzentration $> 2 \mu\text{M}$ pro Bestimmungsansatz. Bei Gegenwart von 0.1 μM Acetessigsäure geben

2 μM RSH	ein Defizit von	0- 5%,
5 μM RSH	ein Defizit von	20-30%,
10 μM RSH	ein Defizit von	95-100%.

In den Enzymansätzen wurden deshalb (zum Schutz von essentiellen SH-Gruppen) nicht mehr als 2 μM Cystein oder Na_2S (polysulfidfrei) zugesetzt. HS^- stört auch in Mengen von 20 μM nicht, da es während des Enteiwessens und Zentrifugierens als H_2S praktisch vollständig entfernt wird.

2. Anorganische Phosphate

In den enteiwessten Versuchsansätzen (6% Trichloressigsäure) wurden bestimmt:

a) Orthophosphat nach FISKE u. SUBBAROW (Lit. 41).

In vielen Fällen wurde, um die Bestimmung empfindlicher zu machen, der angegebene Ansatz auf $\frac{1}{3}$ reduziert (Vol. = 5 ml statt 15 ml). Bei $\lambda = 691 \text{ m}\mu$ und $d = 2.0 \text{ cm}$ ergeben 0.5 μM :

$\Delta E = 0.25$ ($V = 15 \text{ ml}$) resp. $\Delta E = 0.75$ ($V = 5 \text{ ml}$).

b) Pyrophosphat neben Orthophosphat und Nucleotiden nach FLYNN, JONES und LIPMANN (Lit. 42).

c) „Labiles“ anorganisches Phosphat als Orthophosphat nach 10 Minuten Hydrolyse bei 100° in 1n H₂SO₄.

Nucleotide wurden vorher nach den Angaben von LIPMANN u. CRANE (Lit. 43) durch Adsorption an Tierkohle entfernt:

0.50 ml trichloressigsäure Lösung (7%) mit 3 ml 0.1m Na-acetat auf pH 4.4 abpuffern; mit 0.15 g Tierkohle 10 min digerieren.

Fluorophosphat nach den Angaben von FLAVIN et al. (Lit. 50) als „labiles“ Phosphat.

Na₂PO₃F (krist.) wurde nach „Inorganic Synthesis“ (Lit. 72) dargestellt. Nach Phosphatanalyse war der Reinheitsgrad 100%.

Die Orthophosphat-Bestimmung nach MARTLAND u. ROBISON (Lit. 73), bei der die Farbentwicklung in 0.8n schwefelsaurer Lösung (30 min, Raumtemperatur) erfolgt, ist in Gegenwart von PO₃F⁻ nicht anwendbar, da hier bei bereits 17% hydrolysiert werden. Im Ansatz nach FISKE u. SUBBAROW (0.5n H₂SO₄, 10 min) werden dagegen nur 3% gespalten.

Beim Enteiweissen von Reaktionsansätzen ist zu beachten, dass in 7% Trichloressigsäure (Raumtemperatur) hydrolysiert sind:

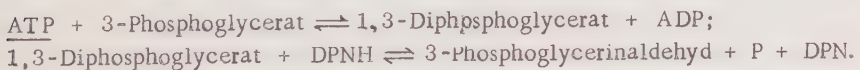
nach 10 min 11 %,
20 min 17 %,
30 min 23 %.

(In den Werten sind die 3% während der P-Bestimmung enthalten.)

Bei der Bestimmung von Fluorophosphat in den Enzymansätzen wurden deshalb die Lösungen vor Zugabe von Trichloressigsäure eisgekühlt, bei 2° von denaturiertem Protein abzentrifugiert und alsbald mit Na-acetat abgepuffert.

3. Adenosin-phosphate

Die Bestimmung der Nucleotide in dem in Tab. 12 beschriebenen Versuch wurde von Frl. Dr. Schuegraf ausgeführt. Die verwendeten optischen Tests basieren auf dem Verschwinden der DPNH-Absorption in folgenden gekoppelten Enzymreaktionen (Lit. 82, 83):



ADP + Phosphoenolpyruvat $\rightleftharpoons$ Pyruvat + ATP;

Pyruvat + DPNH $\rightleftharpoons$ Lactat + DPN.

AMP + ATP $\rightleftharpoons$ 2 ADP;

ADP + Phosphoenolpyruvat $\rightleftharpoons$ Pyruvat + ATP;

Pyruvat + DPNH $\rightleftharpoons$ Lactat + DPN.

ATP-Präparate

Wenn nicht anders angegeben, wurde das $\text{Na}_2\text{H}_2\text{ATP}$ -Präparat der „Zellstoffwerke Mannheim“ verwendet, das mit geringen Mengen AMP und ADP verunreinigt ist; die Mengenangaben beziehen sich auf ATP nach der enzymatischen Bestimmungsmethode.

Als reines Präparat wurde kristallisiertes $\text{Na}_2\text{H}_2\text{ATP} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ der „Sigma Chemical Co.“ verwendet.

III. Enzympräparate

Proteinbestimmung

Wenn nicht anders angegeben, wurde die Biuretmethode nach der Vorschrift von BÜCHER (Lit. 84) verwendet.

1. Arylamin-trans-acetylase

Aktivitätsbestimmung nach LYNEN u. REINWEIN (Lit. 40)

1.60 ml	0.2m K-phosphat pH 6.8
0.07	p-Nitroanilin-Lösung (2.5 µM/ml)
0.03	0.3m K-thioglykolat
0.02	1m Trilon B
0.10	0.3m N, S-Diacetylcysteamin
0.18	Wasser resp. Enzymlösung

Vol. = 2.00 ml; d = 1 cm; λ = 405 mµ; T = 20°.

1 Enzymeinheit verursacht in den ersten Minuten nach Reaktionsstart $\Delta E/\text{min} = 0.001$; spezifische Aktivität: Einheiten pro mg Protein. Der Proteingehalt wurde hier mit der von SEUBERT (Lit. 60) angegebenen Trübungsmethode (modifiziert nach KUNITZ, Lit. 74) ermittelt.

Anreicherungsangang

Mit kleinen Abweichungen wurde die von TABOR, MEHLER u. STADTMAN (Lit. 26) beschriebene Vorschrift verwendet.

Extrakt: 28 g Acetonpulver aus Taubenlebern in mehreren Portionen je 10 min bei Raumtemperatur mit insgesamt 280 ml Wasser (0.3 ml m-Trilon B, pH 7 enthaltend) im Mörser extrahieren; dann auf 0° kühlen und 30 min (18000 x g) zentrifugieren: 218 ml dunkelroter, klarer Extrakt.

Acetonfraktionierung: a) 0-44%. In 217 ml Extrakt 171 ml gekühltes Aceton langsam unter mechanischem Rühren eintropfen (T = -2°). Noch 20 min rühren, dann bei gleicher Temperatur zentrifugieren: 340 ml überstehende Lösung (gelb). b) 44-75%. Überstehende Lösung auf -10° kühlen und in rascher Tropfenfolge 430 ml Aceton (auf -20° gekühlt) einrühren. Anschliessend bei -12° zentrifugieren, überstehende Lösung verwerfen. In den Zentrifugenbechern anhaftende Lösung mit Filterpapier entfernen. Niederschlag in 50 ml Wasser (0.05 ml m-Trilon B pH 7) aufnehmen: 51 ml gelbe Lösung.

Gelschritt: Zu 51 ml der obigen Fraktion werden 75 ml $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Gel ^{+) (16 mg Trockensubstanz/ml) gegeben; nach 10 min Rühren zentrifugieren; überstehende Lösung verwerfen.}

Die überstehende Lösung soll ca 2-4% der eingesetzten Aktivität enthalten. Die erforderliche Gelmenge hängt von der Proteinmenge und von Gehalt und Qualität des Gels ab; pro 1.0 g Protein wurden 1.2-1.8 g Gelrockengewicht benötigt.

Das Gel wird 6-8mal in je 50 ml 0.01m K-phosphat-Puffer (pH 7.8) gründlich suspendiert und nach 10 min Rühren abzentrifugiert. Die vereinigten Eluate mit ca 0.3 g Serumalbumin und 0.2 ml 1m Trilon B versetzen und durch Zugabe von 3-4 ml 0.5m KH_2PO_4 auf pH 7.0-7.2 stellen.

Die Lösung wird alsbald in mehrere Rundkolben gegeben, in dünner Schicht eingefroren und gefriergetrocknet. Man erhält ein schwach gelb gefärbtes Pulver, das über CaCl_2 bei -18° aufbewahrt wird.

Anmerkung: Der Anreicherungsang wird, wenn nicht anders vermerkt, bei 0° und bis vor dem Gefriertrocknen innerhalb von 1 Tag ausgeführt. Die Zugabe von Serumalbumin zu den sehr verdünnten Eluaten ist nötig, um grössere Verluste (statt 20% bis zu 50%) beim Gefriertrocknen zu vermeiden.

Die Aktivität des trockenen Pulvers betrug nach 2 Monaten 90%, nach 4 Monaten 78% der ursprünglichen.

Lösungen des Präparats werden mit reinem Wasser (50-100 mg/ml) hergestellt und gegebenenfalls eingefroren aufbewahrt.

Frisch bereitete Präparate enthalten noch eine geringfügige Desmolaseaktivität, die bei Desmolasebestimmungen in Rechnung gestellt werden muss.

Tabelle: Anreicherung von Acetylase

Fraktion	Einh. $\cdot 10^{-3}$	Protein (g)	spez. Aktivität	Ausbeute (%)
Extrakt	260	7.00	37	(100)
Acetonfällung (44-75%)	183	0.67	273	70
Überstand der Gel-Adsorption	4.8	-	-	2
Eluat	152	0.20	750	58
- nach Gefrier-trocknung	120	-	-	46

^{+) $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Gel der Nitritfabrik A. G., Feldkirchen b. München}

2. Desmolase-Präparat aus Leber

Die Anreicherung erfolgte nach der früher beschriebenen Vorschrift (Lit. 25). Es wurde der Aktivitätstest nach a) verwendet.

Selektive Extraktion: 100 g kleingeschnittene, gefrorene Ochsenleber werden etwa zur Hälfte aufgetaut und mit einer auf -10° gekühlten Lösung von 1.25 g K_2HPO_4 und 0.3 ml 1m Trilon B in 300 ml 20 vol.-%igem Äthanol im Starmix 2 min homogenisiert; Ungelöstes wird in einer Kühlzentrifuge bei -6° durch 1stündiges Zentrifugieren bei 6000 x g abgetrennt. Man erhält 265 ml eines rot gefärbten Extrakts mit 21-23 mg Protein/ml.

Gelschritt: Den Extrakt versetzt man unter Rühren mit 84 ml $Al(OH)_3$ -Gel ^{†)} (10-16 mg Trockengewicht/ml) und zentrifugiert nach 5 min bei -4° ab. Die zu verwerfende orangerote Lösung soll noch 15-20% Aktivität enthalten. Die folgenden Operationen werden bei 0° ausgeführt:

Nach Waschen des Gels mit 200 ml Wasser wird die Aktivität durch 3maliges Behandeln mit insgesamt 160 ml 0.1m Na-pyrophosphat pH 9.3 (m/1000 Trilon B) eluiert, wobei vor dem Zentrifugieren jeweils 15 min gerührt wird.

Fraktionierung mit Ammonsulfat: a) 0-31% Sättigung. Zu je 100 ml der vereinigten, tiefroten Eluate fügt man unter Rühren langsam 16.9 g Ammonsulfat und gleichzeitig 2.0 g fein gepulvertes $Na_4P_2O_7 \cdot 10 H_2O$. Anschliessend wird noch 30 min gerührt, die entstandene Fällung abzentrifugiert und verworfen.

b) 31-43% Sättigung. In die überstehende Lösung werden weitere 6.7 g Ammonsulfat und 2.9 g Pyrophosphat pro 100 ml Überstehendes gegeben. Nach 1stündigem Rühren wird abzentrifugiert und die Fällung in 10 ml Trispuffer pH 8 (0.05m; 0.001m Trilon B) gelöst.

Die grünlich-gelbe (schwach opaleszierende) Lösung wird anschliessend 4 Stunden gegen 1 l 0.01m Trispuffer pH 8 (0.001m Trilon B) dialysiert. Sie wird in kleinere Portionen aufgeteilt und in der Kühltruhe (-18°) eingefroren aufbewahrt.

Das dialysierte Präparat verliert auch im gefrorenen Zustand an Aktivität (bis zu 50% innerhalb von 4 Wochen). Es konnte jedoch jeweils mehrere Monate im Carboxylase-Test (s.d.) verwendet werden.

^{†)} vgl. Anm. S. 72

Tabelle: Anreicherung von Desmolase

Fraktion	Einh. $\cdot 10^{-3}$ (Test a)	Protein (g)	spez. Aktivität	Ausbeute (%)
(Homogenat)	-	-	200	-
Extrakt	2140	5.75	370	(100)
(Überstand der Gel-Adsorption)	350	2.70	130	16
Eluat	1490	1.95	765	70
Ammonsulfatfraktion (31-43 %)	940	0.57	1650	44
- nach Dialyse	600-850	-	-	28-40

3. Carboxylase-Präparat aus Mycobacterium

Das Bacterium wurde von Herrn Dr. Schlegel aus Gartenerde, die dem Wurzelbereich von *Valeriana officinalis* entstammte, isoliert. Es gehört zu der als *Mycobacterium* spp. bezeichneten Gruppe der *Mycobacteriaceae* (BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology, 6th edition 1948). Der Organismus ist ein unbewegliches Kurzstäbchen, grampositiv, säurefest und nitratreduzierend. Der verwendete elektive Nährboden hatte folgende Zusammensetzung:

5 ml	Isovaleriansäure
0.9 g	KH_2PO_4
5 g	NaCl
2 g	NH_4Cl
0.2 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
0.1 g	CaCl_2
Spur	FeSO_4
Spur	MnSO_4
0.03 g	„Bacto Yeast-Extract dehydrated“ ⁺⁾
0.03 g	„Bacto Peptone“ ⁺⁾
(20 g	Agar zur Verfestigung)

auf 1 Ltr. mit Leitungswasser aufgefüllt;
pH 7.8 mit KOH eingestellt.

⁺⁾ Difco Laboratories Inc., Detroit

Das Wachstum ist bei pH um 8 optimal. Der Zusatz von Hefeextrakt und Pepton ist nicht absolut erforderlich, bewirkt jedoch ein beschleunigtes Wachstum. Zur Konservierung des Bacteriums wurden in Abständen von 2-3 Monaten Überimpfungen auf Platten mit festem Nährboden (ohne Hefeextrakt und Pepton) vorgenommen, die mehrere Tage bei 30° bebrütet, dann bei 2° aufbewahrt wurden.

Züchtung in Massenkultur

Die Züchtung der Bakterien in Mengen von je 20-30 g wurde unter sterilen Bedingungen vorgenommen.

Zunächst wurde ein mit 1 l Nährlösung (wie oben angegeben) gefüllter und 3mal im strömenden Dampf sterilisierter Erlenmeyerkolben (2 l) mit einer Öse voll Bakterien beimpft und 5-8 Tage bei 30° bebrütet. Während dieser Zeit wurde wiederholt umgeschüttelt, um eine genügende Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten. Die aufgezogene Bakteriensuspension diente zur Beimpfung eines 5 Ltr.-Absaugstutzens, der mit 3 Ltr. Nährlösung gefüllt und 1mal im Autoklaven (45 min, 120°) sterilisiert war. Der Ansatz wurde in einem Wasserbad 2½ bis 3 Tage bei 30° inkubiert. Dabei wurde mit Hilfe einer Druckpumpe durch ein Glasrohr ständig Luft durch die Suspension geblasen; die Ein- und Austrittsöffnung wurde mit Watte steril verschlossen.

Nach mehreren Stunden setzt eine Verfärbung nach einer gelbbeigen Farbe ein, und es scheiden sich allmählich kleinere Klümpchen ab. Die Zusammenballung der Bakterien, die durch deren Schleimabsonderung verursacht sein dürfte, machte eine Verfolgung des Wachstums anhand von Trübungsmessungen unmöglich.

Wenn die Isovaleriansäure eben aufgebraucht ist (am Verschwinden des intensiven Isovaleriansäuregeruchs erkenntlich), wird eventuell ein Teil (¼ - ½ Ltr.) zur Beimpfung eines neuen Ansatzes verwendet. Aus dem Rest werden die Bakterien durch Zentrifugieren mit einer Durchlaufzentrifuge (50000 x g) gesammelt; die überstehende klare Lösung ist schwach grün gefärbt. Die Bakterien werden nun durch gründliches Suspendieren in ca 5 l Wasser gewaschen und in gleicher Weise resedimentiert. Man erhält eine bräunlich-beige Masse, deren Konsistenz der von gepresster Bäckerhefe ähnelt, wegen des grösseren Wassergehalts aber weicher ist.

Ausbeute: 23-35 g scharf zentrifugierte Feuchtmasse, im Mittel 27 g.

Die Bakterien wurden entweder anschliessend extrahiert oder bei -18° in gefrorenem Zustand aufbewahrt. Dabei werden die Zellen äusserlich nicht geschädigt (kein Aufbrechen der Zellwände), die Enzymaktivität nimmt aber ab; der Verlust beträgt nach 5-7 Tagen ca 10%, nach 2 Wochen ca 25%.

Anmerkung:

Obwohl der maximale Stoffumsatz in der logarithmischen Wachstumsphase erfolgt, war der Gehalt an Carboxylase im Extrakt ebenso hoch, wenn durch den Verbrauch der Isovaleriansäure das Wachstum bereits weitgehend unterbunden war. Dagegen scheint der Extrakt der ausgewachsenen Bakterien weniger Crotonase zu enthalten; im optischen Test ohne Zusatz von Desmolase-Fraktion war in diesem Fall die Wirkung von Faktor II im allgemeinen grösser:

	spez. Akt. des Extraktes	Stimulierung mit Faktor II
Abbruch nach 45 Stunden (noch intensiver Säuregeruch)	250-600	keine bis 2fach
Abbruch nach 70 Stunden (kein Säuregeruch mehr)	250-480	bis 4fach

Massenkulturen wurden einige Male in Ansätzen von 40 Ltr. vorgenommen (Animpfung mit 5 Ltr.-Ansatz). Mangels apparativer Einrichtung konnten diese Mengen jedoch nicht sterilisiert werden, so dass nach spätestens 48 Stunden die Inkubation unterbrochen werden musste, um das Hochkommen von Fremdorganismen zu unterbinden; die Ausbeute war demzufolge viel geringer (ca 15 g/l Ltr.). Eine Infektion wurde in einem Fall dadurch festgestellt, dass in dem Extrakt p-Nitroacetanilid hydrolysierendes Enzym nachgewiesen wurde, welches in der Reinkultur fehlt.

Extraktion

Die Zellen wurden durch ca 10 min. intensives Zerreiben mit Al_2O_3 -Pulver („Alumina A-303“⁺⁾) im eisgekühlten Porzellanmörser aufgeschlossen. Um die Angriffsfläche (und damit die Ausbeute) möglichst gross zu halten, wurden nur je 5-10 g Zellen verwendet. Die für optimalen Aufschluss erforderliche Al_2O_3 -Menge hängt von dem Feuchtigkeitsgrad der Zellmassen ab; sie betrug im Mittel 7-8 g/5 g Zellen.

Die Paste wurde anschliessend in eiskaltem 0.02-0.03m Trispuffer pH 7.6 (m/1000 Trilon B) digeriert, dann hochtourig zentrifugiert und der Rückstand noch zweimal in gleicher Weise extrahiert (insgesamt ca 25 ml Puffer/5 g Zellen). Man erhält einen bräunlich-beigen Extrakt mit mehr oder weniger starker Opaleszenz; die Ausbeute an gelöstem Protein beträgt 40-60 mg pro 1 g Zellen.

⁺⁾ Aluminium Company of America, Pittsburgh

Gefriertrocknung der Zellen

20 g frisch geerntete Zellen werden in 50 ml Wasser suspendiert, in dünner Schicht im Rundkolben eingefroren und gefriergetrocknet. Man erhält ca 3,5 g sehr leichtes, beigefarbenes Pulver, das bei 2° im Exsiccator aufbewahrt wird. Unter Zusatz einiger Tropfen Puffer werden 0,4 g mit 2 g Al_2O_3 -Pulver wie oben zerrieben und mit 10 ml Puffer extrahiert.

Dieses Präparat wurde für die Anreicherung des Faktors II aus Ochsenleber benützt. Es enthält Carboxylase in einer spezifischen Aktivität von ca 300 und Desmolase in grossem Überschuss, aber nur wenig Faktor II; die Stimulierung bei Zusatz von Faktor II beträgt ca 3,5fach. Der Extrakt ist bei 0° einige Tage haltbar, verliert beim Einfrieren aber rasch an Aktivität.

Anreicherungs-gang

(Alle Operationen bei 0° -2°)

Extraktion: 45 g feuchte Zellen wurden wie oben beschrieben aufgeschlossen und mit 0,03m Trispuffer (0,001m Trilon B) extrahiert: 202 ml zentrifugierter Extrakt (12,4 mg Protein/ml).

Fraktionierung mit Protamin: 201 ml des Extrakts, der ein pH von 8,3 besitzt (Glaselektrode), wurden tropfenweise mit 20 ml 1proz. Protaminsulfatlösung versetzt. Nach 20 min Rühren wurde abzentrifugiert und der Niederschlag verworfen.

Die überstehende Lösung (207 ml; 8,9 mg/ml) wurde unter Rühren mit 7,8 ml 0,5m Formiatpuffer (pH 4,0) auf pH 7,4 gestellt und langsam mit weiteren 12,4 ml Protaminsulfatlösung versetzt. Nach 20 min wurde abzentrifugiert (20000 x g) und der Niederschlag verworfen. Die überstehende Lösung (222 ml; 6 mg/ml) wurde über Nacht bei 0° aufbewahrt.

1. Ammonsulfat-Fraktionierung: a) 0-33,5% Sättigung. 220 ml Lösung wurden mit 41 g Ammonsulfat und 0,3 ml 2n NH_3 versetzt, der Niederschlag nach 40 min bei 20000 x g abzentrifugiert und verworfen.

b) 33,5-55,5%. Die überstehende Lösung (233 ml) wurde mit weiteren 33,5 g Ammonsulfat und 0,3 ml 2n NH_3 versetzt; das pH war ca 7,7. Nach 45 min wurde der Niederschlag abzentrifugiert und in 38 ml m/60 Trispuffer pH 7,5 gelöst; 46,5 ml braungelbe, opaleszierende Lösung (19,2 mg/ml).

2. Ammonsulfat-Fraktionierung: a) bis 40% Sättigung. 45 ml der obigen Fraktion wurden mit 45 ml Wasser verdünnt, mit 17,7 g Ammonsulfat langsam versetzt und 1 Stunde gerührt. Der Niederschlag wurde durch 40 min. Zentrifugieren (30000 x g) abgetrennt und verworfen.

b) 40-51.5% Sättigung. In die überstehende Lösung (90 ml; fast klar), die ein pH ca 6.5 hatte, wurden weitere 6.05 g Ammonsulfat eingetragen sowie ca 0.3 ml 2n NH_3 , um ein pH 6.5 bis 7.0 aufrecht zu erhalten. Nach 1 Stunde wurde der Niederschlag gesammelt und in 9 ml Trispuffer pH 7.5 aufgenommen. Man erhält 9.6 ml einer schwach gelb gefärbten, wenig opaleszierenden Lösung (Fraktion AS II₂; 13 mg/ml).

Der Anreicherungsangang ist in Tab. 7 zusammengefasst.

Das Präparat ist bei 0° einige Tage, bei -18° einige Wochen stabil.

Andere, in den Abbildungen aufgeführte Präparate wurden aus dem Überstand der Protaminfällung durch Ammonsulfatfraktionierung in den angegebenen Sättigungsgrenzen erhalten.

4. Carboxylase-Präparat aus Leber

(Alle Operationen bei 0° -2°)

Homogenat: 500 g gefrorene Ochsenleber werden nach Auftauen mit 1.0 Ltr. 0.05m K_2HPO_4 (0.001m Trilon B) 3 min im Starmix homogenisiert; das durch 80 min Zentrifugieren bei 6500 x g annähernd vollständig von Ungelöstem befreite Homogenat wird zur Entfernung von Fett durch ein Nesseltuch filtriert; Vol. = 1.15 Ltr.

1. Ammonsulfat-Fraktionierung: a) 0-35% Sättigung. In das Homogenat werden langsam 218 g Ammonsulfat eingerührt sowie ca 12 ml 2n NH_3 , um ein pH 8 aufrecht zu erhalten. Nach 40 min Rühren wird abzentrifugiert und der Niederschlag verworfen.

b) 35-51% Sättigung. In den fast klaren Überstand (840 ml) werden 79 g Ammonsulfat und ca 3 ml NH_3 gegeben. Es wird noch weitere 40 min gerührt, dann zentrifugiert (60 min; 6500 x g). Der klare, rotgefärbte Überstand wird verworfen; den Niederschlag löst man in 200 ml 0.001m Trilon B: 295 ml opaleszierende Lösung, die über Nacht bei -18° aufbewahrt wird.

Gelschritt: Die Ammonsulfatfraktion wird durch Verdünnen mit 0.001m Trilon B auf einen Ammonsulfat-Sättigungsgrad von 8% gebracht. Der ursprüngliche Sättigungsgrad wird ermittelt, indem man beim Aufnehmen des Niederschlags die Volumenzunahme misst und diese auf eine Ammonsulfatlösung von 50% Sättigung zurückführt; er beträgt im allgemeinen 16%.

In die verdünnte Lösung (pH 7.5-7.6) werden pro 1 g Protein 10.7 ml $\text{Al}(\text{OH})_3\text{-Gel}^{+}$

^{+) vgl. Anm. S. 72}

(10.6 mg Trockengewicht/ml) eingerührt. Diese Menge (im angegebenen Fall 170 ml) reicht aus, um ca 95% der Aktivität und ca 33% des Proteins zu adsorbieren.

Das abzentrifugierte Gel wird zunächst mit 170 ml 0.25m KCl behandelt, wobei geringe Mengen unwirksamen Proteins entfernt werden. Die Aktivität wird dann durch 3maliges Digerieren in insgesamt 250 ml Ammonsulfatlösung (15 g Ammonsulfat in 0.001m Trilon B, mit konz. NH_3 auf pH 8.9 gestellt; Vol. = 100 ml) eluiert, wobei vor dem Zentrifugieren jeweils 15 min gerührt wird.

2. Ammonsulfat-Fraktionierung: a) bis 47% Sättigung. Zu je 100 ml der vereinigten, grünlich-gelben Eluate werden 13.0 g Ammonsulfat gegeben; pH = 8.6. Die grüne Fällung wird nach 40 min Rühren abzentrifugiert und verworfen.

b) 47-58% Sättigung. Zu je 100 ml des nunmehr klaren, goldgelben Überstands werden 6.65 g Ammonsulfat gegeben; pH = 8.0; der nach 50 min Rühren gesammelte Niederschlag wird in 0.005m Trispuffer pH 8 gelöst und bei -18° aufbewahrt.

Alkoholfraktionierung in Gegenwart von Zn^{++} und Cystein: Hierfür wurde nur ein Teil des Ansatzes nach 4 Wochen Aufbewahrung verwendet.

12.5 ml Ammonsulfat-Fraktion (480 mg; sp. Akt. 90) werden mit 10 ml Wasser und 22.5 ml Zinksulfat-Cystein-Lösung (m/250 ZnSO_4 , m/50 Cystein·HCl; mit KOH neutralisiert) versetzt. Es herrschen folgende Bedingungen: pH (Glas-elektrode) = 8.0; $c_{\text{Zn}^{++}} = 0.002\text{m}$; $c_{\text{Cystein}} = 0.01\text{m}$; $c_{\text{Protein}} = 10.7 \text{ mg/ml}$; Ammonsulfatgehalt ca 3-4% Sättigung.

a) 0-14.7%: Unter genauer Einhaltung einer Temperatur von 0° werden unter ständigem Rühren 8.1 ml 96proz. Äthanol (auf -15° gekühlt) zugetropft. Nach weiteren 50 min Rühren wird die entstandene Fällung bei 0° (3 min; 10000 xg) abzentrifugiert und verworfen.

b) 14.7-20.6%: Zu der überstehenden Lösung (52 ml) werden in gleicher Weise 4.05 ml Äthanol gegeben, die Fällung nach 20 min gesammelt und in ca 3 ml 0.02m Trispuffer pH 7.9 gelöst. Man erhält 3.2 ml einer hellgelben, schwach opaleszierenden Lösung, die bei 0° aufbewahrt mehrere Tage stabil ist.

Der Anreicherungs-gang ist in Tab. 3 zusammengefasst. Vor der Aktivitätsmessung wurden alle Fraktionen wie bei Tab. 4 angegeben mit 0.05m Cystein vorinkubiert.

5. Faktor II aus Leber

Aktivitätstest

200 μ M Tris/HCl-Puffer pH 8,1
 100 KHCO_3
 16 MgCl_2
 10 Thioglykolat
 0.15 p-Nitroanilin
 3 ATP
 0.2 HIV-CoA
 80 Einh. Acetylase
 0.26 mg Extrakt aus gefriergetrockneten Mycobakterienzellen
 Faktor II-Lösung

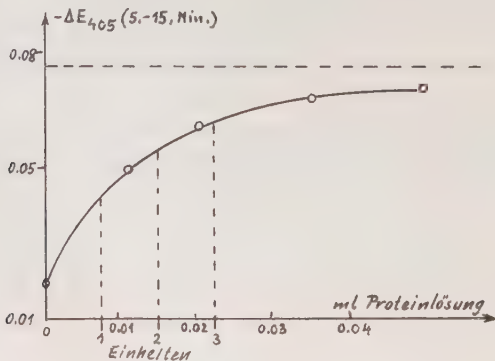
Vol. = 1.60 ml; d = 1 cm; T = 20°; λ = 405 m μ .

Der Gehalt des Bakterienextrakts an Desmolase war so hoch, dass unter den obigen Testbedingungen mit HMG-CoA (anstelle von HIV-CoA und ATP) $\Delta E/\text{min}$ = 0.030 erfolgte.

Ohne Faktor II betrug $\Delta E_{5.-15. \text{ min}}$ = 0.021; mit überschüssigem Faktor II = 0.076. Als 1 Enzymeinheit des Faktors II wurde die Menge definiert, die eine Stimulierung auf ΔE = 0.042, d.h. die doppelte Geschwindigkeit, verursachte. Es wurden jeweils 2 oder 3 Tests mit verschiedenen Mengen ausgeführt und durch Interpolation die der Definition von 1 Einheit entsprechende Menge ermittelt.

Enzymverdünnungen wurden mit m/30 Trispuffer (pH 7.6), 1 mg Serumalbumin pro ml enthaltend, vorgenommen.

Die Carboxylase-Aktivität des Leberextrakts musste wegen der sehr geringen, zum Test verwendeten Mengen nicht berücksichtigt werden.



Anreicherung

(Alle Operationen bei 0°, wenn nicht anders vermerkt)

Homogenat: 465 g gefrorene Ochsenleber werden nach Auftauen mit 1.165 Ltr. 0.05m K_2HPO_4 (0.001m Trilon B) 3 min im Starmix homogenisiert und anschliessend durch ein Nesseltuch filtriert, um Bindegewebe zu entfernen: Vol. = 1.47 Ltr.

Zur Aktivitäts- und Proteinbestimmung wird eine Probe (10 ml) 60 min bei 20000 x g annähernd klar zentrifugiert.

Säurefällung: Zu 1.46 Ltr. des Homogenats werden innerhalb 100 min 650 ml 0.1n H_2SO_4 , das 2 ml Trilon B (1m) enthält, aus einem Tropftrichter gegeben, wobei die Spitze des Ausflusses in die kräftig gerührte Lösung taucht. Anschliessend wird noch 20 min gerührt; pH der Lösung = 5.55 (Glaselektrode). Die Fällung wird bei 6000 x g abzentrifugiert und verworfen.

Der annähernd klare Überstand wird sofort mit 20 ml 2m Trislösung auf pH = 7.15 (Glaselektrode) gestellt. Vol. = 1.47 Ltr.; Nucleinsäuregehalt nach der Bestimmung von WARBURG (Lit. 89): 1.25% der Proteinmenge.

Acetonfällung: a) 0-30%. In die Lösung (1.47 Ltr.) werden 628 ml Aceton (auf -18° gekühlt) langsam eingerührt, wobei die Temperatur auf -5° gebracht wird. Nach 20 min Rühren wird der Niederschlag bei -5° abzentrifugiert und verworfen.

b) 30-41%. Aus der überstehenden Lösung (1.95 Ltr.) wird die Aktivität mit 360 ml Aceton ausgefällt, die Temperatur wird dabei auf -10° gebracht. Nach 10 min wird bei der gleichen Temperatur abzentrifugiert. Den Niederschlag löst man in 0.05m Trispuffer pH 8 (0.001 m Trilon B): opaleszierende, olivbraune Lösung; Vol. = 102 ml.

Die Lösung wird anschliessend 4 Stunden gegen 4 Ltr. 0.01m Trispuffer pH 8 (0.002m Trilon B) dialysiert, dann bei 0° über Nacht aufbewahrt.

1. Ammonsulfatfraktionierung: a) 0-45% Sättigung. Das Dialysat wird zunächst mit 0.001m Trilon B auf ein Volumen von 250 ml verdünnt und unter Rühren mit 65 g Ammonsulfat versetzt; pH = 7.1. Nach 30 min wird der Niederschlag, der 10% der Aktivität des Dialysats enthält, abzentrifugiert und verworfen.

b) 45-85% Sättigung. In die orangerote überstehende Lösung werden weitere 65 g Ammonsulfat eingerührt sowie tropfenweise 0.9 ml 2n NH_3 ; pH = 7. Nach 30 min wird zentrifugiert und die Fällung in 0.05m Trispuffer pH 8 aufgenommen; Vol. = 42 ml.

Die klare rote Lösung wird gegen 4 Ltr. 0.01m Trispuffer pH 8 (0.001m Trilon B) 3 Stunden dialysiert, wobei nach 1½ Std. die Pufferlösung erneuert wird.

Hitzeschritt: 55 ml Dialysat werden mit 0.001m Trilon B auf 101 ml verdünnt: pH = 7.2 (Glaselektrode); Ammonsulfatgehalt nach der Bestimmung von FRITZ u. FREEHAND (Lit. 87) (vgl. Ausführung bei Lit. 27): 0.45% Sättigung.

Die Lösung wird unter kräftigem Rühren in einem Wasserbad von 68° innerhalb 3 min auf 52° erwärmt, 2 min bei dieser Temperatur gehalten und dann durch eine Eiskochsalzmischung rasch auf 0° gekühlt. Der entstandene Niederschlag wird abzentrifugiert; die Lösung wird über Nacht bei -18° aufbewahrt.

2. Ammonsulfatfraktionierung: a) 0-50% Sättigung. In 87 ml des Hitzesaftes werden 25.3 g Ammonsulfat und 0.4 ml 2n NH₃ gerührt; der Niederschlag wird nach 30 min abzentrifugiert und verworfen.

b) 50-65% Sättigung. In die überstehende Lösung (95.5 ml) werden 8.8 g Ammonsulfat und 0.2 ml 2n NH₃ gegeben. Die abzentrifugierte Fällung wird in 0.05m Trispuffer (pH 8) aufgenommen: 11.5 ml AS II_b (rot).

c) 65-85% Sättigung. In den Überstand (94 ml) werden 12.2 g Ammonsulfat und 0.2 ml 2n NH₃ gegeben und die gesammelte Fällung in Trispuffer aufgenommen: 8 ml AS II_c (rot).

Die Fraktion AS II_c wurde anschliessend 5 Stunden gegen 4 Ltr. m/80 Trispuffer pH 8.1 (0.001m Trilon B) dialysiert und bei -18° aufbewahrt.

Der Anreicherungsangang ist in Tab. 9 zusammengefasst.

6. Hemmung der Desmolase durch p-Chlormercuribenzoat (CMB)

Ergebnis: vgl. Tab. 23

Vorinkubation

Je 0.20 ml Enzymlösung (Trispuffer pH 7.5) wurden mit der angegebenen Menge CMB-Lösung (pH 7.5) 15 min bei Raumtemperatur (ca 20°) inkubiert.

Desmolase-Test

Aktivitätsbestimmung im DPN-Test (Fig. 18), ohne Zusatz von Thioglykolat. — Mit 0.1 µM Acetyl-CoA betrug ΔE/min = 0.08. Die Aktivität der Hilfsenzyme nach Ablauf des Desmolase-Tests ist in der letzten Spalte angegeben.

Reaktivierung

Die vorinkubierte Lösung wurde mit der angegebenen Menge Cysteinlösung (pH 7-8) erneut 15 min bei 20° inkubiert.

Enzyme: a) Mycobakterienfraktion AS (51-60); 14.1 mg/ml.

b) 4 Monate aufbewahrtes Desmolasepräparat aus Leber (dial. AS-Fraktion); 18.2 mg/ml.

CMB-Lösung: bei a) 1.74 $\mu\text{M}/\text{ml}$; bei b) 13.4 $\mu\text{M}/\text{ml}$.

Die Konzentration war spektrophotometrisch nach BOYER (Lit. 75) bestimmt.

a) Mycobacterium

ml CMB	cCMB ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	ml vorinkub. Lösung/Test	ΔE (2.-7.Min.) $\cdot 10^3$	$\Delta E/\text{min}$ nach Zusatz von Acetyl-CoA
1) -	0	0.020	68	-
2) 0.01	0.083	0.021	68	-
3) 0.02	0.158	0.022	68	-
4) 0.03	0.227	0.023	35	-
5) 0.04	0.29	0.024	4.5	0.070
6) 0.06	0.40	0.026	1	-
7) 0.10	0.58	0.030	0	0.065
0.23 ml 6) + 0.015 ml m-Cystein	(0.40)	0.03	76.5	-

b) Ochsenleber

ml CMB	cCMB ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	ml vorinkub. Lösung/Test	ΔE (2.-7.Min.) $\cdot 10^3$	$\Delta E/\text{min}$ nach Zusatz von Acetyl-CoA
1) 0	0	0.01	51	-
2) 0.01 1:10	0.064	0.01	42	-
3) 0.03 1:10	0.175	0.01	39	-
4) 0.01	0.64	0.01	30	-
5) 0.03	1.75	0.01	1	0.050
0.22 ml 5) + 0.03 ml 0.4 m Cystein	(1.75)	0.01	43	-

7. Versuche zur Abtrennung der Desmolase von Carboxylase in Mycobacterium-Präparaten

1) An $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Gel wird Carboxylaseprotein bevorzugt adsorbiert. Die Elution mit Ammonsulfatlösungen ist jedoch mit erheblichen Aktivitätsverlusten verbunden.

Beispiel:

Die AS-Fraktion (33-56%) wurde mit Formiatpuffer auf pH 6.3 gestellt; Vol. = 18 ml; Proteinmenge = 173 mg; m/120 Trispuffer; m/120 Formiatpuffer.

$\text{Al}(\text{OH})_3$ -Gel: 4 ml (64 mg Trockengewicht) ⁺⁾

Elutionsmittel: Je 6 ml Ammonsulfatlösung des angegebenen Sättigungsgrads und pH.

	Aktivität (%)		Protein (mg)
	Desmolase	Carboxylase	
Vor Adsorption	(100)	(100)	173
Gel-Überstand	69	13	93
Eluat 1 (10%; pH 8.0)	-	9	} 35
Eluat 2 (10%; pH 8.9)	-	4	
Eluat 3 (20%; pH 8.5)	-	3	

2) Die Löslichkeit der beiden Enzymproteine in Ammonsulfatlösungen ist sehr ähnlich; der Trenneffekt beim Fraktionieren mit Ammonsulfat ist geringfügig.

Beispiel:

Sättigungsgrenzen	Carboxylase (spez. Aktivität)	Desmolase
0-60 %	130	190
13-28 %	145	157
28-41 %	195	140
41-51 %	265	330
51-60 %	55	180

⁺⁾ vgl. Anm. S. 72

3) Die partielle Abtrennung der Desmolase gelingt durch Protaminfällung; das Enzym wird bevorzugt gefällt.

Beispiel:

Je 3.0 ml Extrakt (m/30 Trispuffer; 14 mg Protein) wurden bei angegebenem pH mit Protaminsulfat versetzt, die Fällung nach 15 min abzentrifugiert.

	pH der Lösung	8.3	7.9	7.4	6.9
	mg Protamin-sulfat	1.5	1.0	1.0	0.8
Aktivität im Überstand (%):	Desmolase	17	45	20	25
	Carboxylase	25	89	73	92

4) Zwischen pH 6 und 7 bestehen keine wesentlichen Unterschiede in der Stabilität der Enzyme.

Der Protaminsulfat-Überstand wurde 12 Stunden bei angegebenem pH (0°) aufbewahrt, dann die Aktivität bestimmt; Protein: 3.25 mg/ml.

pH	Aktivität (%)	
	Desmolase	Carboxylase
7.1	108	105
6.5	97	99
6.0	104	87

IV. Coenzym A-Derivate

Die S-Acyl-Coenzym A-Derivate wurden nach den Richtlinien von SIMON u. SHEMIN (Lit. 30) für die Darstellung von Succinyl-CoA gewonnen. Die verwendeten Coenzym A-Präparate hatten einen Reinheitsgrad von 0.49-0.70.

1.) β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym A

Als Acylierungsmittel diente das innere Anhydrid der β -Hydroxy- β -methyl-glutarsäure ($C_6H_8O_4$). Seine Darstellung aus der freien Säure mittels Acetanhydrid und die Umsetzung mit CoA erfolgte wie früher beschrieben (Lit. 25, 27).

Der Gehalt der HMG-CoA-Lösungen an aktiver Thiolester-Komponente wurde aus der Extinktionsabnahme im optischen Desmolase-Test (Test b: pH 7.3) und ϵ_p -Nitroanilin = 10500 ermittelt:

$$c = \frac{\Delta E \cdot V}{10.5 \cdot v} \quad (\mu M/ml)$$

(ΔE = gesamte Extinktionsabnahme, V = Vol. des Testansatzes,
 v = eingesetztes Vol. HMG-CoA-Lösung)

Beispiel: Einwaage: 30.7 mg CoA (60proz.) = 23.7 μM
 Volumen nach Umsetzung = 3.0 ml

Gehaltsbestimmung ($V_{Test} = 1.81$ ml):		
v (ml)	0.015	0.030
ΔE_{405}	0.238	0.467
c ($\mu M/ml$)	2.73	2.68
Gesamtmenge:	8.12 μM	

Ausbeute: 34.2% bezogen auf CoA-Einwaage;
 = 68% d.Th.

Alle HMG-CoA-Mengenangaben beziehen sich auf enzymatisch aktives Substrat.

2.) β -Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A

Nach der Methode von WIELAND u. RUEFF (Lit. 31) zur Gewinnung von β -Hydroxy-butyryl-CoA diene hier als Acylierungsmittel eine Lösung des Anhydrids aus β -Hydroxy-isovaleriansäure und Äthylkohlsäure in Tetrahydrofuran.

Anhydrid-Lösung

Eine Lösung von 286 mg Hydroxyisovaleriansäure (2.4 mM) in 2.5 ml absolut wasserfreiem und peroxydfreiem Tetrahydrofuran (frisch über Na-Draht destilliert) wird mit 0.33 ml (2.4 mM) Triäthylamin (über Na destilliert) neutralisiert und in Eis-Kochsalzmischung auf -15° gekühlt. Unter Ausschluss von Feuchtigkeit werden langsam 0.23 ml Chlorameisensäure-äthylester (2.4 mM) in ca 1 ml Tetrahydrofuran zugetropft. Nach 20 min wird das ausgeschiedene Triäthylammoniumchlorid rasch abgesaugt und mit wenig Lösungsmittel nachgewaschen. Das Filtrat wird weiterhin bei -15° gehalten.

Vol. = 4.0 ml; Gehalt nach Einwaage: 0.6 mM Anhydrid/ml.

Umsetzung mit CoA

60.0 mg 60proz. CoA ($46.5 \mu\text{M}$) in 2 ml Wasser werden mit ca 0.3 ml n-KOH neutralisiert und zur Reduktion von evtl. vorliegendem Disulfid mit 2 ml neutralisierter Thioglykolsäurelösung ($470 \mu\text{M/ml}$) versetzt und bei pH 8-9 20 min bei 20° inkubiert.

Die Mischung wird dann mit 0.5 ml gesättigter KHCO_3 -Lösung abgepuffert und im Eisbad mit kleinen Anteilen der frisch bereiteten Anhydridlösung versetzt. Dabei wird N_2 durch die Lösung geblasen, um gute Durchmischung zu erzielen und durch kontinuierliches Abdunsten von Tetrahydrofuran die Ausbildung von zwei Flüssigkeitsphasen zu vermeiden. Man entnimmt laufend Proben und prüft mit Nitroprussidnatrium auf SH_2 bis zum vollständigen Verschwinden der Reaktion werden ca 2.5-3.1 ml (d.h. 150-200% der theoretischen Menge Anhydridlösung) benötigt.

Die Mischung wird mit 2n HCl auf pH 2-3 angesäuert, wobei sich ein Teil der S-HIV-Thioglykolsäure ölig abscheidet. Unter Eiskühlung werden das Thioglykolsäure-Derivat, Tetrahydrofuran und andere ätherlösliche Anteile durch 2stündiges Perforieren mit peroxydfreiem Äther abgetrennt. Dabei wird, um die Bildung von Peroxyden zu unterbinden, durch den Rückflusskühler ein schwacher CO_2 -Strom eingeführt. Nachdem mittels N_2 Äther ausgetrieben wurde, wird die wässrige Lösung auf pH 5 gestellt und gefriergetrocknet. Das stark salzhaltige Produkt wird in Wasser aufgenommen und bei -18° , bzw. wenn im Gebrauch bei 0° , gehalten. Vol. = 3.9 ml.

Anmerkung: Das Produkt enthielt verschiedentlich geringe Mengen von Tri-äthylamin, erkenntlich am Geruch bei der alkalischen Verseifung. Es wurde durch Ansäuern der Lösung auf pH 2 mit einigen Spatelspitzen Kationenaustauscher-Harz (Amberlite IR 120) entfernt. Nach Abfiltrieren und Nachwaschen mit wenig Wasser wurde die Lösung wieder auf pH 5 gestellt.

Analyse

Differenzspektrum:

Verseifungsansatz:

0.035 ml HIV-CoA-Lösung

0.88 H_2O

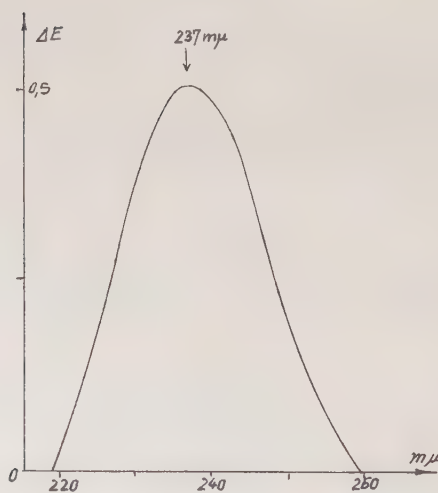
0.16 2n KOH;

20 min bei 20° unter N_2 inkubiert, dann

0.16 ml 2n HCl

2.00 m/15 Phosphatpuffer pH 7

V = 3.23 ml



Spektrum der unverseiften Lösung (gleicher Puffer und Reagenzien) gegen Verseifungsansatz; $d = 1 \text{ cm}$; $\lambda_{\text{max}} = (236-237) m\mu$;

$$\Delta E_{\text{max}} = 0.510.$$

Unter Annahme von $\varepsilon = 4500$ (vgl. S. 96) ergibt sich

$$\begin{aligned} \text{S-Acyl} &= \frac{0.51 \cdot 3.23}{4.5 \cdot 0.035} ; \\ &= 10.5 \mu\text{M/ml} \end{aligned}$$

Gesamtmenge: $41 \mu\text{M} = 88\%$ der CoA-Einwaage.

Die Ausbeute an S-Acyl-Menge betrug in allen Ansätzen innerhalb 76-88% der CoA-Einwaage.

Enzymtest:

Wegen störender Nebenreaktionen mit unreinen Enzympräparaten war eine zuverlässige Bestimmung nur mit einem einzigen HIV-CoA-Präparat auszuführen. Mit der in Tab. 15 angegebenen Versuchsanordnung und 0.4 mg Protein der Bakterienfraktion AS II₂ wurden folgende Werte erhalten:

HIV-CoA-Lösung	Acetessigsäure gebildet	Gehalt d. Lsg.
0.05 ml	0.41 μM	7.5-8.2 $\mu\text{M/ml}$
0.20 ml	1.50 μM	

Das Präparat war aus 65proz. CoA dargestellt; der S-Acyl-Gehalt betrug 10.6 $\mu\text{M/ml}$.

Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich alle Mengenangaben im Teil I auf die S-Acylmessung.

3.) Isovaleryl-Coenzym A

Als Acylierungsmittel diente Isovaleriansäureanhydrid, das durch Umsetzung von Säurechlorid mit K-Salz erhalten wurde;

Kp. $102^\circ/15 \text{ mm Hg}$.

10.2 mg 70proz. CoA (9.2 μM) wurden, wie bei HIV-CoA beschrieben, mit 220 μM Thioglykolat reduziert; $V = 1.5 \text{ ml}$. Nach Zusatz von 0.3 ml gesättigter KHCO_3 -Lösung wurde die Lösung bei 0° durch kräftiges Schütteln mit 0.10 ml Anhydrid suspendiert unter Zusatz von 0.5 ml Tetrahydrofuran. Nach Verschwinden von -SH wurde die Mischung mit HCl auf pH 2-3 angesäuert und 5mal mit je 5 ml peroxylfreiem Äther ausgeschüttelt. Nach Ausblasen des Äthers mit CO_2 wurde die Lösung auf pH 5 gestellt.

Vol. = 2.7 ml; Gehalt nach CoA-Einwaage: 3.4 $\mu\text{M/ml}$.

4.) β -Methyl-crotonyl-Coenzym A

Als Acylierungsmittel diente β -Methyl-crotonsäure-anhydrid, das aus Säurechlorid und K-Salz erhalten wurde; Kp. 131-33°/12 mm Hg.

1. Präparat:

63 mg 70proz. CoA (56.8 μ M) in 1 ml Wasser wurden mit 0.35 ml n-KOH neutralisiert. Zur Reduktion von Disulfid wurde bei 0° H₂S eingeleitet und mit KOH ein pH 8-9 aufrechterhalten; nach 1 Stunde wurde auf pH 4 angesäuert und H₂S durch CO₂ ausgetrieben. Die mit KHCO₃ abgepufferte Lösung wurde mit 0.03 ml Anhydrid versetzt und mit Hilfe eines kräftigen N₂-Stroms in feiner Suspension gehalten. Nach 1 Stunde war kein freier Thioalkohol mehr nachzuweisen (Nitroprussidreaktion). Durch 5maliges Ausschütteln mit peroxydfreiem Äther wurde nach Ansäuern auf pH 3 überschüssiges Anhydrid und Säure entfernt, Äther durch CO₂ ausgetrieben und die Lösung auf pH 5 gestellt; Vol. = 2 ml.

Gehaltsbestimmung: 0.02 ml gaben im Enzymsatz (wie bei HIV-CoA) 0.175 μ M Acetessigsäure; Ausbeute: 17.5 μ M aktiver Thiolester (31% nach CoA-Einwaage).

2. Präparat:

Als Ausgangsmaterial diente hier ein bei der Verarbeitung von Hefe anfallendes Quecksilbersalz des CoA, das u.a. noch Glutathion enthält. Das Präparat wurde partiell gereinigt nach einem bei (Lit. 78) beschriebenen Verfahren.

3 g Hg-Salz ergaben 11.5 ml einer Lösung von 58 μ M CoA.

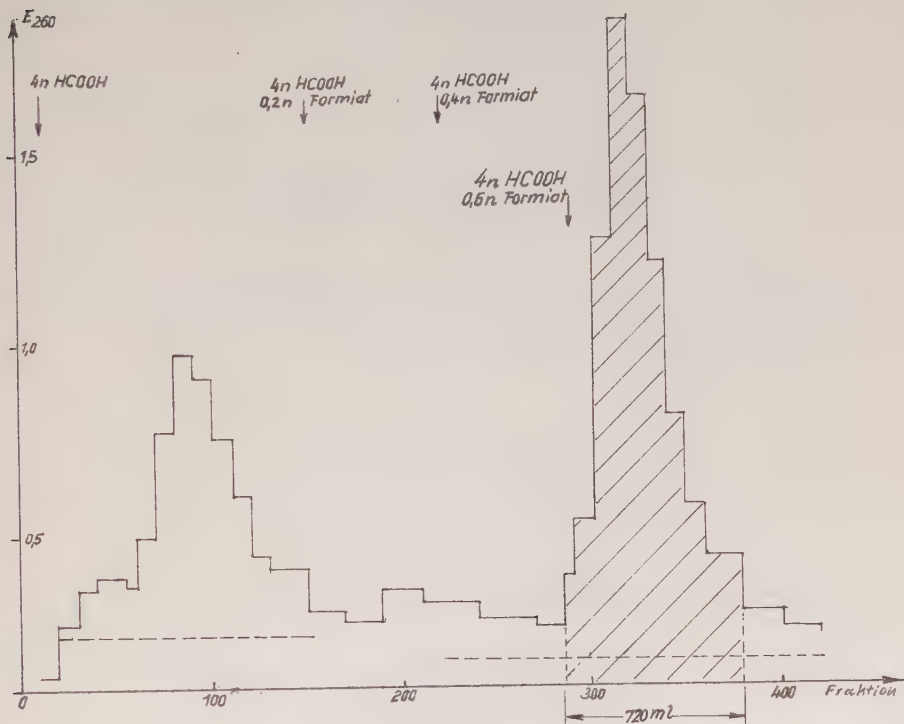
Bei 0° wurde die Lösung mit n-KOH auf pH 7.5 gestellt, mit 0.8 ml Methylcrotonsäure-anhydrid versetzt und unter N₂ kräftig geschüttelt, wobei mit KOH pH 7-8 eingehalten wurde. Die Nitroprussid-Reaktion auf freies -SH war nach 10 min negativ. Unverbrauchtes Anhydrid wurde mit peroxydfreiem Äther ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung wurde mittels Amberlite IR 120 auf pH 2-3 gestellt und nochmals zur Entfernung von Methylcrotonsäure mit Äther ausgeschüttelt; Vol. = 26 ml.

Gehalt nach Acetessigsäure-Bildung: 39 μ M MC-CoA.

Reinigung durch Ionenaustauscher-Chromatographie:

Die Chromatographie erfolgte bei 2° an Dowex-1 (Formiatform) nach den Angaben von GRASSL (Lit. 90) für die Reinigung von Crotonyl-CoA (vgl. auch HURLBERT et al. (Lit. 79)).

Nach Aufsetzen der Lösung auf die Säule (Volumen des Harzes = 50 ml) wurde bei 90-100 mm Hg (Pressluft) mit ca 1.5 Ltr. HCOOH (bis 4n) und ca 2.5 Ltr. Formiatpuffer (4n HCOOH + 0.2 bis 0.6n HCOONa) chromatographiert. Die Eluate wurden in Fraktionen von 7-9 ml gesammelt und ihre Absorption bei 260 m μ gemessen. Die Elution des MC-CoA erfolgt mit Formiatpuffer (4n HCOOH + 0.4-0.6n HCOONa).



— E_{260} der Fraktionen gegen Wasser; - - - - E_{260} des Elutionsmittels gegen Wasser ($d = 1$ cm).

Zur Entsalzung und Konzentrierung wurden die aktiven Fraktionen (720 ml) mit $MgSO_4$ gesättigt und das CoA-Derivat mit wassergesättigtem Phenol extrahiert. Nach Waschen mit einer Lösung aus 1 TL. 2n H_2SO_4 , 9 TL. Wasser und 5 TL. $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ wird der Extrakt mit Äther versetzt und MC-CoA mit Wasser reextrahiert; $V = 50$ ml. — Zur Entfernung von $MgSO_4$ wird MC-CoA nochmals mit Phenol extrahiert und der Extrakt mit wenig Wasser sulfatfrei gewaschen. Nach Verätzen mit Äther wird mit Wasser reextrahiert und restliches Phenol ausgeäthert. Die wässrige Lösung wird gefriergetrocknet.

Das erhaltene reinweisse Pulver (17.5 mg) wurde in Wasser aufgenommen und mit KOH auf pH 4-5 gestellt; Vol. = 1.8 ml.

Gehaltsbestimmung:

a) Differenzspektrum:

Verseifungsansatz:

0.02 ml	MC-CoA-Lösung
0.22	H ₂ O
0.10	1.7n KOH;
60 min	bei 25° unter N ₂ inkubiert, dann
0.07 ml	2.4n HCl
1.60	m/15 Phosphatpuffer pH 7.0

$$V = 2.01 \text{ ml.}$$

Das Spektrum der unverseiften Lösung (gleicher Puffer und Reagenzien) gegen den Verseifungsansatz ist in Fig. 24, Kurve 1 gezeigt; d = 0.5 cm.

Mit $\Delta E_{260} = 0.513$ ($\epsilon = 11300$) ergibt sich

$$\begin{aligned} c_{\text{S-Acyl}} &= \frac{0.513 \cdot 2.01}{11.3 \cdot 0.5 \cdot 0.02} \\ &= \underline{9.12 \text{ } \mu\text{M/ml}} \end{aligned}$$

b) Adeninbestimmung bei 260 m μ :

0.02 ml	MC-CoA-Lösung
5.00	m/15 Phosphatpuffer pH 7.0

$$V = 5.02 \text{ ml; } d = 0.5 \text{ cm}$$

$$E_{260} \text{ (gegen Puffer)} = 0.530;$$

der Wert muss korrigiert werden um die Absorption der Thiolesterbindung; sie beträgt mit $\epsilon_{260} = 10700$ ($c = 0.0364 \text{ } \mu\text{M/ml}$); $E = 0.195$.

$$E_{260} \text{ (korr.)} = 0.335.$$

Mit $\epsilon_{260}^{\text{Adenin}} = 16000$ ergibt sich

$$\begin{aligned} c &= \frac{0.335 \cdot 5.02}{16.0 \cdot 0.5 \cdot 0.02} \\ &= \underline{10.51 \text{ } \mu\text{M/ml}} \end{aligned}$$

c) Bestimmung im Enzymtest (Ansatz siehe Tab. 16):

0.05 ml Lösung ergaben 0.41 μM Acetessigsäure,

0.10 ml Lösung ergaben 0.79 μM Acetessigsäure;

$$\bar{c} = \underline{8.0 \mu\text{M/ml}}$$

Zur Ermittlung der Michaeliskonstante (Fig. 11) wurde der Mittelwert aus S-Acyl- und Enzymtest $\bar{c} = 8.5 \mu\text{M/ml}$ verwendet.

V. Thiolester von Cysteamin-Derivaten

1.) S-(β -Methyl-glutaryl)-N-acetyl-cysteamin ($C_{10}H_{17}O_4NS$; $M = 247.3$)

N-Acetyl-cysteamin wurde durch Acetylierung von Cysteamin mit Acetanhydrid in Methanol nach den Angaben von SEUBERT (Lit. 80) (vgl. auch Lit. 81) dargestellt; Kp. $126^\circ/\text{Ölpumpe}$.

1.314 g (12.5 mM) N-Acetyl-cysteamin in 10 ml Wasser und 1 ml Tetrahydrofuran wurden mit 0.4 ml n-KOH neutralisiert. In kleinen Portionen wurden 1.68 g (13.1 mM) Methylglutarsäure-anhydrid eingerührt sowie ca 2 g $KHCO_3$ zur Abpufferung. Nachdem innerhalb von 10 min -SH verbraucht war, wurde die Hauptmenge des Tetrahydrofurans i.V. abgezogen, die Lösung mit HCl angesäuert, wobei sich ein Teil des Thiolesters als Öl abscheidet. Die Mischung wurde mit 10 ml Äther ausgeschüttelt; die Ätherphase, die ca 10% des Thiolesters enthielt, wurde verworfen. Die Ölphase wurde in Essigester aufgenommen, die wässrige Lösung zur Vervollständigung der Abscheidung mit $(NH_4)_2SO_4$ gesättigt und mit Essigester extrahiert.

Aus den vereinigten Essigesterlösungen wurden 2.6 g öliges Rohprodukt erhalten, das nach mehrtägigem Aufbewahren im Vakuumexsiccator (2°) kristallin erstarrte. Durch wiederholtes Umkristallisieren aus trockenem Essigester (40°), dem bis zur beginnenden Trübung ca 0.35 Vol. Petroläther zugefügt wurden, liessen sich (unter Vernachlässigung der Mutterlaugen) 0.80 g (= 26% d.Th.) prismatisch kristallisierten Thiolesters gewinnen; Schmp. 70° .

Titration:

45.7 mg (in 10 ml Wasser + 2 ml Methylalkohol) verbrauchten 1.87 ml n/10 NaOH.

$$\text{Äquivalentgewicht: } \frac{45.7}{0.187} = 244.5;$$

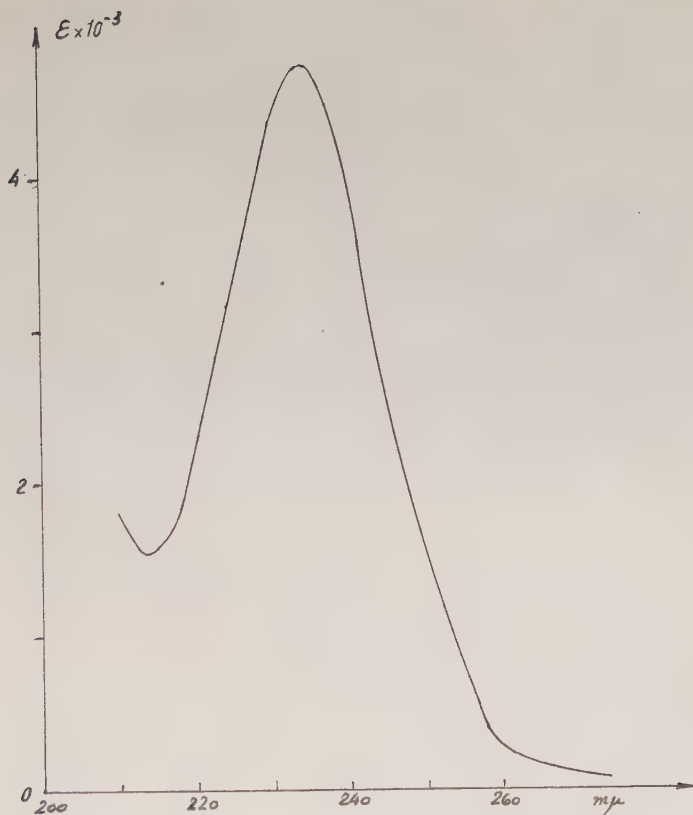
ber. 247.3.

UV-Spektrum:

Einwaage: 5.299 mg (21.426 μM)
in 112.5 ml m/15 Phosphatpuffer, pH 7;
 $c = 190.5 \cdot 10^{-6} m$

$$E_{234} = 0.451 \quad (d = 0.5 \text{ cm})$$

$$\epsilon_{234} = \frac{0.451}{190.5 \cdot 0.5} \cdot 10^6 = \underline{4740}$$



2.) S-(β -Hydroxy-isovaleryl)-N-acetyl-cysteamin ($C_9H_{17}O_3NS$; $M = 219.3$)

Aus 1.90 g (16.1 mM) Hydroxyisovaleriansäure wurde — wie bei HIV-CoA beschrieben — eine Lösung des Anhydrids mit Äthylkohlsäure in Tetrahydrofuran dargestellt. Vol. = 21 ml; Gehalt nach Einwaage: 0.77 mM/ml.

0.88 g (8.4 mM) N-Acetyl-cysteamin in 20 ml Wasser wurden mit 0.27 ml n-KOH neutralisiert und mit 1 g $KHCO_3$ abgepuffert, dann bei 0° in kleinen Portionen mit 13.5 ml Anhydridlösung (10.3 mM) versetzt. Nach quantitativer Umsetzung (20 min) wurden weitere 0.5 g $KHCO_3$ und KCl bis zur Sättigung zugegeben und der Thiolester mit Essigester (4 x 15 ml) extrahiert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels hinterblieb ein farbloser Sirup, der nicht weiter gereinigt wurde.

UV-Spektrum:

Einwaage: 32.2 mg (= theor. 147 μ M)

in 60 ml Wasser;

1 : 10 mit m/15 Phosphatpuffer pH 7.0 verdünnt;

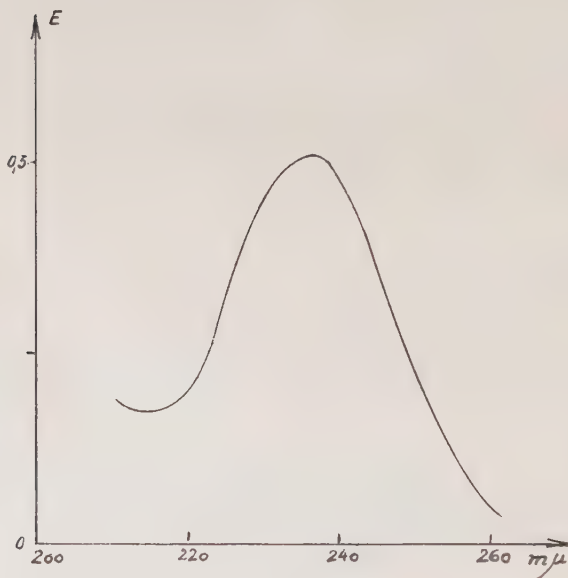
$$c_{\text{theor.}} = 245 \cdot 10^{-6} \text{ m}$$

$$\lambda_{\text{max}} = 236 \text{ m}\mu$$

$$E_{236} = 0.517 \text{ (d} \approx 0.5 \text{ cm)};$$

$$„\epsilon” = 4220$$

Bei Annahme eines reellen Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 4500$ (wie er für den Thiolester der β -Hydroxy-buttersäure angegeben wird (Lit. 62)), besitzt das Präparat einen Reinheitsgrad 0.94.



3.) S-(β -Methyl-crotonyl)-N-succinyl-cysteamin ($C_{11}H_{17}O_4NS$; $M = 259.3$)

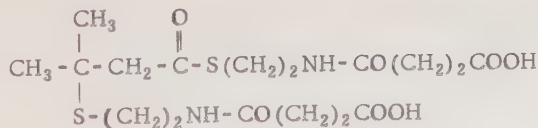
177 mg (1 mM) N-Succinyl-cysteamin ^{†)} in 2.0 ml Wasser wurden mit 1.1 ml n-KOH neutralisiert und mit 0.4 g $KHCO_3$ abgepuffert. Die Lösung wurde mit 0.2 ml β -Methylcrotonsäure-anhydrid versetzt und bei 2° mit Hilfe eines Vibromischers emulgiert. Die Umsetzung war nach 90 min beendet. Beim Ansäuern mit 5n HCl schied sich eine kleine Menge öligen Produkts ab. Zur Entfernung der Hauptmenge Methylcrotonsäure wurde 2mal mit wenig Äther ausgeschüttelt. Die wässrige Phase, die noch ca 80% des Thiolesters enthält, wurde mit Ammonsulfat gesättigt und 4mal mit Essigester ausgeschüttelt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels hinterblieb ein öliges Rückstand, der nach einigen Tagen Aufbewahrung im Exsiccator (über KOH) kristallin erstarrte. Das Produkt wurde 4mal aus trockenem Essigester (unter Zusatz von Petroläther) umkristallisiert; Schmp. und Spektrum blieben nach der 2. Kristallisation konstant. Unter Vernachlässigung der Mutterlaugen wurden ca 40 mg (= 15% d.Th.) nadeliges Kristallinat erhalten; Schmp. 88°.

UV-Spektrum:(Fig. 23)

Einwaage: 4.999 mg
in 150 ml m/15 Phosphatpuffer pH 7.0
 $c = 128.5 \cdot 10^{-6} \text{ m}$
 $d = 0.5 \text{ cm}; E_{245} = 0.726 \text{ } (\epsilon = 11300)$
 $E_{240} = 0.648 \text{ } (\epsilon = 10090)$

Nebenprodukt

In verschiedenen Ansätzen, namentlich bei der Umsetzung bei Raumtemperatur, entstand neben dem α, β -ungesättigten Thiolester eine etwa gleiche Menge eines Nebenprodukts, das in Essigester etwas schwerer löslich ist. Die Analyse des partiell gereinigten, amorphen Produkts ergab, dass es sich wahrscheinlich um das Additionsprodukt von N-Succinyl-cysteamin an den α, β -ungesättigten Thiolester handelt:



Die Additionsreaktion wurde auch bei der Darstellung von S-Crotonyl- und S-Octenoyl-Derivaten beobachtet (Lit. 62, 88, 90).

^{†)} Für die Überlassung des Präparats danke ich Herrn Eggerer.

Titration:

16.6 mg (in 3 ml Wasser + 2 ml Methanol) verbrauchten 0.757 ml n/10 NaOH.

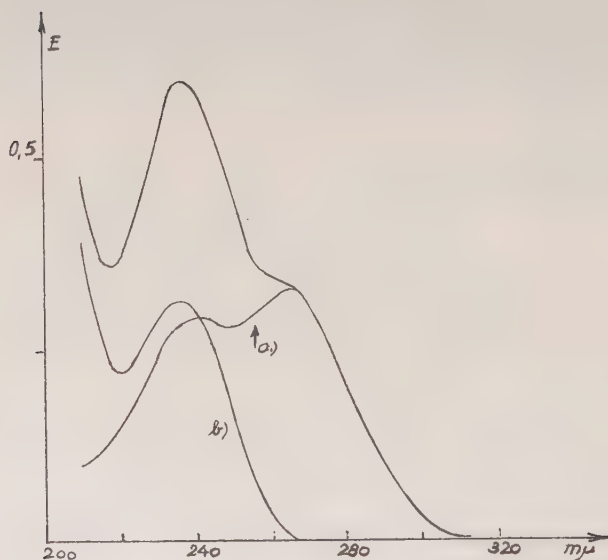
Äquivalentgewicht: 219.5

(ber. für Additionsprodukt: 218)

UV-Spektrum:

2.953 mg in 37.5 ml m/15 Phosphatpuffer pH 7.0; d = 0.5 cm;

$$E_{238} = 0.605; E_{266} = 0.330.$$



Das Spektrum lässt sich in zwei Komponenten zerlegen: Spektrum des α, β -ungesättigten Thiolesters (a); Spektrum eines gesättigten Thiolesters ($\lambda_{\max} = 233-235 \text{ m}\mu$), wie für das Additionsprodukt zu erwarten. (b). Letzteres zeigt allerdings bei $\lambda \leq 220 \text{ m}\mu$ eine Abweichung vom theoretischen Spektrum.

Aus E_{266} (a) und E_{233} (b) berechnen sich folgende Thiolester-Mengen:

$$\begin{array}{lcl} \alpha, \beta\text{-unges. Thiolester:} & \frac{0.330 \cdot 37.5}{11.3 \cdot 0.5} & = 2.19 \mu\text{M} (= 0.57 \text{ mg}) \\ \text{Gesätt. Thiolester:} & \frac{0.317 \cdot 37.5}{4.6 \cdot 0.5} & = 5.16 \mu\text{M} (= 2.25 \text{ mg}) \\ \text{(Additionsprodukt)} & & \\ & & \underline{2.83 \text{ mg} =} \\ & & \text{(96 \% d. Einwaage)} \end{array}$$

Das mittlere Äquivalentgewicht dieser Mischung errechnet sich zu:

$$\frac{2.19}{7.35} \cdot 259 + \frac{5.16}{7.35} \cdot 218 = \underline{230}$$

Wenn die Gewichts Differenz von 0.12 mg eventuell noch vorhandener Methylcrotonsäure zugeschrieben wird, deren Gegenwart durch die hohe Absorption bei $\lambda \approx 220 \text{ m}\mu$ in (b) angezeigt ist, beträgt das mittlere Äquivalentgewicht = 212.

Proben von

S-(β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl)-N-capryl-cysteamin

($\lambda_{\text{max}} = 236\text{-}237 \text{ m}\mu$; $\epsilon = 4.9 \cdot 10^3$),

S-Glutaryl-N-succinyl-cysteamin

($\lambda_{\text{max}} = 233 \text{ m}\mu$; $\epsilon = 4.8 \cdot 10^3$)

wurden mir von Herrn Eggerer zur Verfügung gestellt, dem ich dafür Dank schulde.

Spektrum von β -Methyl-crotonsäure

Zur Messung wurde eine mehrmals aus Wasser rekristallisierte Substanz, Schmp. $69^\circ\text{-}70^\circ$, verwendet. In m/15 Phosphatpuffer pH 7 ist die Extinktion im Absorptionsmaximum ($\lambda = 208\text{-}210 \text{ m}\mu$) nicht linear von der Konzentration abhängig; bei $d = 0.5 \text{ cm}$ betragen die Werte:

c (μM/ml)	E ₂₀₉	ε ₂₀₉
0.2194	0.915	8350
0.1097	0.485	8850
0.0548	0.259	9450

Das Spektrum für $c = 0.1 \cdot 10^{-3}$ m ist in Fig. 23 aufgezeichnet. Zum Differenzspektrum des Thiolesters (Fig. 24, Kurve 1) wurde die Extinktion der Säure bei der Konzentration 0.091 μM/ml addiert unter Zugrundelegung der ε-Werte der Fig. 23.

VL Spaltung der Thiolester

1.) Alkalische Hydrolyse

Die Kinetik der alkalischen Verseifung wurde nach der Methode von NODA, KUBY u. LARDY (Lit. 67) durch Messung der S-Acylbande ermittelt. Es wurde die Versuchsanordnung von SEUBERT (Lit. 60) verwendet.

Ausführung:

Die wässrige Lösung des Thiolesters (ca $1 \mu\text{M/ml}^+)$; mit NaOH bis pH 5-6 gestellt) und 0.2n NaOH werden 15 min im Thermostat equilibriert. Zum Zeitpunkt 0 werden zu 10 ml Thiolesterlösung 10 ml NaOH aus einer rasch fließenden Pipette gegeben; die Ausfluss- und Mischzeit betrug 5-10 sec. Im Ansatz herrschen demnach folgende Bedingungen: ca $0.5 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ Thiolester; 0.1n NaOH.

2 ml werden aus dem Ansatz pipettiert und zum Abstoppen der Reaktion in 2 ml einer Mischung von je 1 Teil m/15 Phosphatpuffer pH 7.0 und 0.2n HCl gegeben. Die Extinktion dieser Lösung wird in einer Küvette der Schichtdicke 0.5 cm gemessen ($= E_t$); die Blindküvette enthält eine Mischung von je 1 Teil Wasser, Phosphatpuffer, 0.2n NaOH und 0.2n HCl.

Für die Bestimmung der Extinktion zur Zeit 0 (E_0) wird 1 ml der ursprünglichen Thiolesterlösung zu 3 ml einer Mischung von je 1 Teil Phosphatpuffer, 0.2n HCl und 0.2n NaOH gegeben; Blindküvette wie oben.

E wurde jeweils am Absorptionsmaximum des betreffenden Thiolesters gemessen; E_0 betrug 0.45 bis 0.55.

Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten:

Die Reaktionsgleichung 2. Ordnung

$$k \cdot t = \frac{1}{a-b} \ln \frac{b(a-x)}{a(b-x)} \quad \begin{aligned} a &= [\text{NaOH}]_{\text{anfang}}; \\ b &= [\text{Thiolester}]_{\text{anfang}} \end{aligned}$$

vereinfacht sich mit $a \gg b$ und $a \gg x$ zu

$$k = \frac{2.302}{a \cdot t} \log \frac{b}{b-x}$$

$$b = \frac{E_0}{\epsilon_{\text{Thiolester}}}$$

$$x = \text{Konzentrationsabnahme des Thiolesters} = \frac{E_0 - E_t}{\Delta \epsilon}$$

$$\Delta \epsilon = \epsilon_{\text{Thiolester}} - \epsilon_{\text{Thiol}} - \epsilon_{\text{Säure}}$$

⁺) bei Methylecrotonyl-Derivat ca $0.5 \mu\text{M/ml}$

a) Thiolester der gesättigten Säuren:

$\varepsilon_{\text{Säure}}$ ist bei den fraglichen Wellenlängen ≈ 0 .

$\varepsilon_{\text{Thiol}}$ bei 233-236 m μ ≈ 150 (Lit. 60)

Da $\varepsilon_{\text{Thiolester}} = 4700-4900$, wird $\Delta\varepsilon \approx 0.97\varepsilon$.

Mit $\varepsilon : E_0 = \Delta\varepsilon : 0.97 \cdot E_0$ ergibt sich

$$\log \frac{b}{b-x} = \log \frac{1}{1 - \frac{E_0 - E_t}{0.97 \cdot E_0}}$$

b) Thiolester der β -Methyl-crotonsäure:

Da bei 266 m μ $\varepsilon_{\text{Thiol}}$ und $\varepsilon_{\text{Säure}} \approx 0$, ergibt sich

$$\log \frac{b}{b-x} = \log \frac{E_0}{E_t}$$

Die Geschwindigkeitskonstante k wurde graphisch aus der Neigung der Geraden

$$\log \frac{b}{b-x} = f(t) \text{ ermittelt; } a = [\text{NaOH}] = 0.1n.$$

Die Aktivierungsenergie wurde berechnet nach

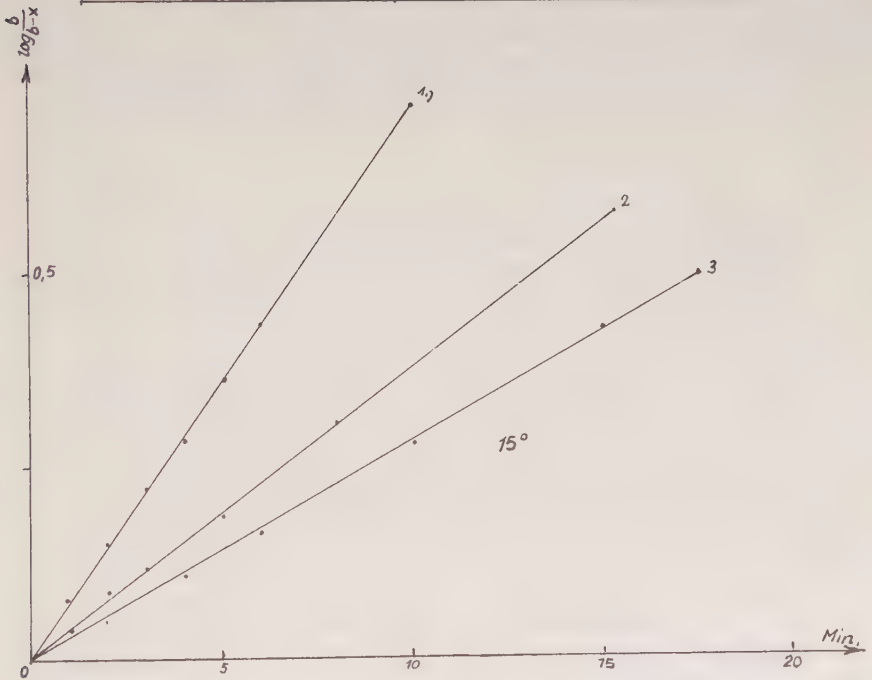
$$\Delta H = R \frac{T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \ln \frac{k_2}{k_1}.$$

Zusammenfassung der Werte, siehe Tab. 27.

Beispiel:

S-(β -Methyl-glutaryl)-N-acetyl-cysteamin; $T = 25.1^\circ\text{C}$; $\lambda = 234 \text{ m}\mu$.

$t \text{ [min]}$	E_t	$E_0 - E_t$	$\frac{E_0 - E_t}{0.97 \cdot E_0}$	$\log \frac{b}{b-x}$
0	0.542 ($= E_0$)	0	0	0
1	0.475	0.067	0.127	0.059
2	0.410	0.132	0.251	0.126
3	0.356	0.186	0.354	0.190
4	0.307	0.235	0.447	0.358
5	0.265	0.277	0.526	0.324
8	0.174	0.368	0.700	0.523
10	0.129	0.413	0.785	0.668
15	0.072	0.470	0.894	0.975

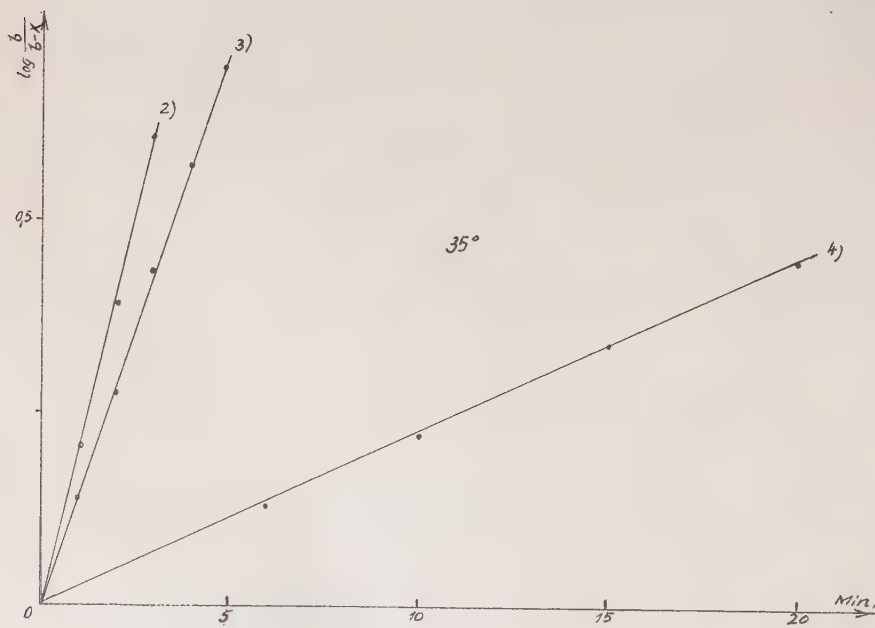
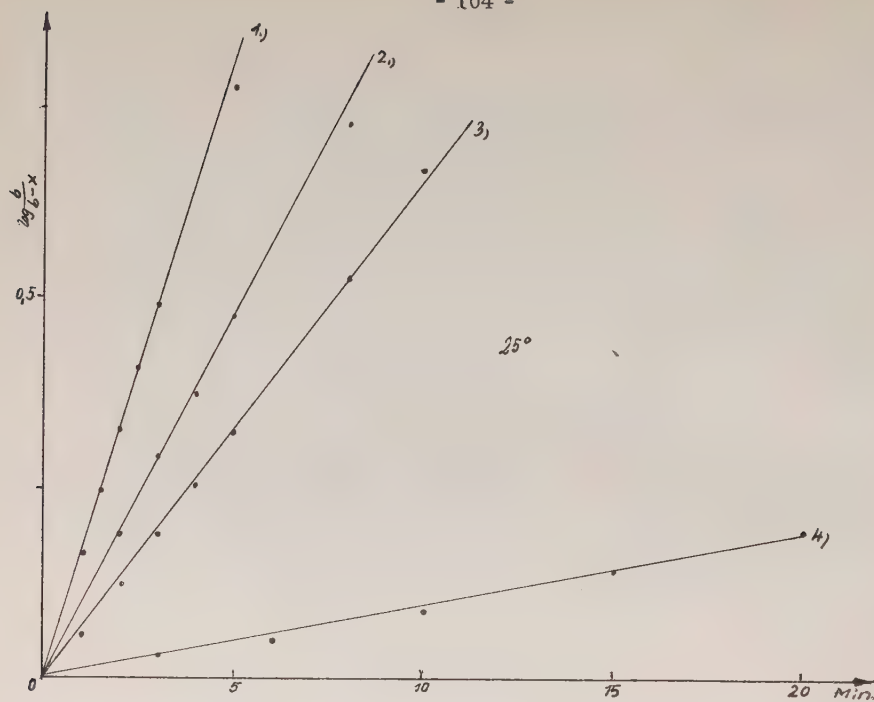


(1) Glutaryl-

(2) Hydroxymethylglutaryl-

(3) Methylglutaryl-

(4) Methylcrotonyl-Thiolester



2.) Hydroxylaminolyse

Die Umsetzung und die kolorimetrische Bestimmung der Hydroxamsäuren erfolgte nach LIPMANN u. TUTTLE (Lit. 63) in der bei (Lit. 64) angegebenen Modifikation.

Ausführung:

NH₂OH-Lösung: Frisch bereitete Mischung von gleichen Volumina 4.0m NH₂OH·HCl und 3.5m NaOH; pH der Lösung (nach Verdünnen 1:3 mit Wasser) = 7.1 (Glaselektrode).

FeCl₃-Lösung: Mischung von gleichen Volumina 5% FeCl₃ (in 0.1n HCl), 12% Trichloressigsäure und 3n HCl.

Nach 10 min Equilibrieren im Thermostaten (30°) werden 15 ml Thiolesterlösung (ca 2 µM/ml; mit NaOH auf pH 6,7 gestellt) und 7.5 ml NH₂OH-Lösung gemischt. Es werden je 1.5 ml aus dem Ansatz pipettiert und zu 1.5 ml FeCl₃-Lösung gegeben. Die Farbe wird sofort bei 546 mµ in einer Küvette, d = 1 cm, gemessen; der Wert wird korrigiert gegen die Extinktion einer Mischung von 1.5 ml FeCl₃-Lösung, 0.5 ml NH₂OH-Lösung und 1 ml Thiolesterlösung oder Wasser (in angegebener Reihenfolge pipettiert).

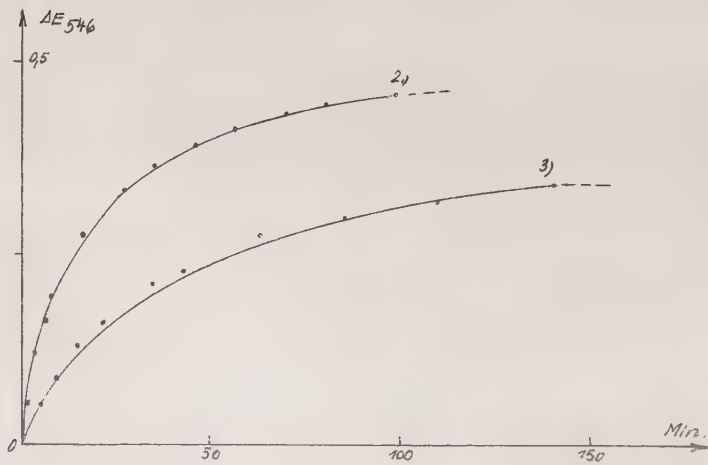
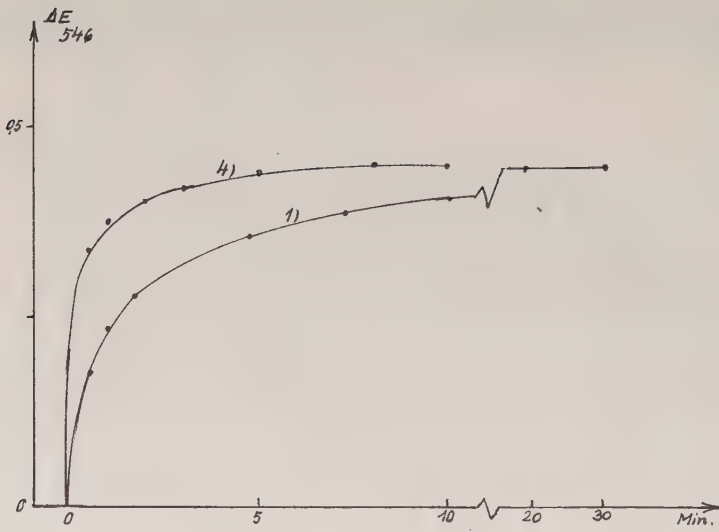
Anmerkung:

Die Hydrolyse während der Equilibrierungs- und Inkubationszeit wurde nicht berücksichtigt. Sie beträgt für das HMG-Derivat (0.15 µM/ml) bei pH 7.0 (Phosphatpuffer) und 30° nach 140 min ca 6%.

Aus der Dissoziationskonstante für 25°K = $1.04 \cdot 10^{-6}$ (Lit. 76) und [NH₂OH] + [NH₃OH⁺] = 0.67m errechnet sich die Konzentration an freiem NH₂OH im Inkubationsansatz (pH 7.1) zu $\approx 0.62m$.

Thiolester	µM pro Bestimmung +)	ΔE ₅₄₆ (Ende)	ΔE/µM
(1) Glutaryl-	1.9	0.448	0.236
(2) Methylglutaryl-	2.0	≈ 0.460	≈ 0.230
(3) HMG-	1.5	≈ 0.340	≈ 0.230
(4) (Acetyl-)	2.0	0.452	0.226

+ nach UV-Absorption



Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten:

Wegen des Überschusses an NH_2OH gilt wie bei der alkalischen Hydrolyse

$$k \sim \frac{1}{t} \cdot \log \frac{b}{b-x}.$$

Die Funktion $\log \frac{b}{b-x} \left(= \frac{\Delta E_{\infty}}{\Delta E_{\infty} - \Delta E_t} \right) = f(t)$

ist in Fig. 25 dargestellt. Linearität besteht nur bis zum Wert $\log b/(b-x) \simeq 0.3$.

Beispiel:

S-(β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl)-N-capryl-cysteamin

t [min]	ΔE_t	$\Delta E_{\infty} - \Delta E_t$	$\log \frac{b}{b-x}$
2	0.024	0.316	0.032
5	0.053	0.287	0.073
9	0.085	0.255	0.125
15	0.127	0.213	0.204
22	0.159	0.181	0.274
35	0.209	0.131	0.414
85	0.297	0.043	0.898
140	0.340 ($=\Delta E_{\infty}$)	0	-

3.) Ammonolyse

Die Messung erfolgte durch die „verzögerte Nitroprussid-Reaktion“ nach LYNEN (Lit. 65).

Ausführung:

- 2.0 ml gesättigte Ammonsulfatlösung
 - 1.0 Wasser resp. Thiolesterlösung
 - 0.3 Nitroprussid-natrium-Lösung (2%)
 - 0.3 konz. Ammoniak
-

Die Lösungen wurden bei der angegebenen Temperatur equilibriert;

Messung in temperierten Küvetten, $d = 1 \text{ cm}$; $\lambda = 546 \text{ m}\mu$.

E_0 = Extinktion vor Zugabe von Ammoniak,

$E_{\max}$ = Extinktion im Scheitelpunkt, $\Delta E_{\max} = E_{\max} - E_0$.

$t_{0.5}$ = Zeit zur Erreichung von $\Delta E_{\max}/2$ (t_0 bei Zugabe von NH_3).

(1) Glutaryl-, (2) Methylglutaryl-, (3) HMG-, (4) HIV-Thiolester:

	T (°C)	μM	$\Delta E_{\max}$	μM	$\Delta E_{\max}$	$\Delta E_{\max}/0.1 \mu\text{M}$	$t_{0.5} \text{ (min)}$
(1)	23.5	0.22	0.324	0.44	0.629	0.145	0.5
(2)	23.5	0.23	0.186	0.46	0.368	0.080	4
(3)	24.5	0.45	0.139	0.90	0.235	0.029	9
(4)	24.5	0.45	0.120	0.90	0.240	0.027	6

(Mengen nach UV-Absorption)

Die Kinetik der Farbentwicklung ist in Fig. 26 wiedergegeben.

Die Färbung der Merkaptane mit Nitroprussid-natrium nach GRUNERT u. PHILLIPS (Lit. 66) ist weitgehend übereinstimmend. Im doppelten Ansatz der bei (Lit. 77) angegebenen Testausführung betragen die Werte (bei 20° , $d = 1 \text{ cm}$, $\lambda = 546 \text{ m}\mu$):

	$\Delta E/0.1 \mu\text{M}$ (nach 15 sec)
N-Succinyl-	0.167
N-Capryl-	0.159
N-Acetyl-cysteamin	0.152

Zusammenfassung

1) Die wesentlichen Stufen des biologischen Abbaus der ketogenen Aminosäure Leucin sind nach Befunden von COON am Herzmuskel die Carboxylierung von β -Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A unter Beteiligung von Adenosintri-phosphat und die Spaltung des hierbei entstehenden β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym A in Acetyl-Coenzym A und Acetessigsäure. Folgende Ergebnisse wurden bei der Untersuchung dieser Reaktionen erhalten:

a) Zur Bestimmung der beteiligten Enzyme wurde ein zusammengesetzter optischer Test aufgebaut, der auf der Acetylierung von p-Nitroanilin mittels Acetyl-Coenzym A und Arylamin-trans-acetylase beruht. Die hierzu benötigten Substrate wurden nach bekannten Methoden durch Acylierung von Coenzym A mit entsprechenden Säureanhydriden gewonnen.

b) Das carboxylierende Enzymsystem liess sich aus Ochsenleber ca 70fach anreichern bei einer Ausbeute von 12%. Aus der Reaktivierung älterer Präparate mittels Cystein konnte auf die Gegenwart essentieller SH-Gruppen im Enzymprotein geschlossen werden. Für systematische Versuche waren die Präparate — namentlich wegen der Gegenwart Adenosintri-phosphat hydrolysierender Enzyme — nicht verwendbar.

c) In gegenüber Leberhomogenat bis zu 75fach höherer Aktivität wurde das carboxylierende Enzymsystem in einer Mycobacteriumart aufgefunden, die auf einem elektiven Nährmedium mit Isovaleriansäure als Kohlenstoffquelle wächst.

Das aus dem Zellextrakt ca 10fach angereicherte Präparat benötigte zur Carboxylierung von Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A ein zweites Enzym, das in geringer Menge im rohen Bakterienextrakt, in hoher Konzentration in Leberhomogenaten enthalten war und aus letzteren partiell gereinigt wurde. Seine katalytische Wirkung wurde dahingehend geklärt, dass es β -Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A zu β -Methyl-crotonyl-Coenzym A dehydratisierte; es ist mit dem Enzym Crotonase des Fettsäurecyclus identisch.

Im Gegensatz zu der Reaktion im Herzmuskel erfolgt die CO_2 -Fixierung hier an einer der geminalen Methylgruppen des α, β -ungesättigten Coenzym A-Derivats. Für den Abbau von Isovaleryl-Coenzym A in Mycobacterium ergab sich hieraus zwangsläufig folgendes Schema:

- 1) Dehydrierung zu β -Methyl-crotonyl-Coenzym A,
- 2) Carboxylierung zu β -Methyl-glutaconyl-Coenzym A,
- 3) Hydratisierung zu β -Methyl- β -hydroxy-glutaryl-Coenzym A,
- 4) Spaltung zu Acetyl-Coenzym A und Acetessigsäure.

Eine erste biologische Funktion der in Leber entdeckten Methylglutaconase, welche die reversible Wasseranlagerung gemäss 3) katalysiert, wurde mit diesem Schema aufgezeigt. In der Bakterienzelle ist das Enzym in 25facher Konzentration gegenüber der Leberzelle enthalten.

Die Bildung der Reaktionsprodukte Acetyl-Coenzym A und Acetessigsäure in äquimolaren Mengen wurde nachgewiesen.

Parallel mit der Carboxylierung erfolgt — anders als bei der analogen Reaktion im Herzmuskel — die Spaltung des Adenosintriphosphats in Adenosindiphosphat und Orthophosphat.

Einige Versuche zum Nachweis der Aktivierung von CO_2 durch Adenosintriphosphat, die der CO_2 -Fixierung vorausgehen sollte, waren ergebnislos. Die sich anhand bekannter analoger Aktivierungsreaktionen bietenden Möglichkeiten über den Mechanismus der Carboxylierung wurden diskutiert.

Das pH-Optimum des carboxylierenden Enzyms wurde zu pH 7.2-8.5 ermittelt. Die katalytische Wirkung ist an die Gegenwart von Mg-Ionen gebunden. Die Michaeliskonstanten der Enzym-Substrat-Komplexe mit Adenosintriphosphat und Methyl-crotonyl-Coenzym A betragen $1.1 \cdot 10^{-4}$ resp. $8.5 \cdot 10^{-5}$ (Mol/l). Die Affinität zur Kohlensäure ist sehr hoch; das eigentliche Substrat scheint das Ion HCO_3^- zu sein.

d) Die Verteilung des β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym A spaltenden Enzyms in tierischen Organen und in Mycobacterium wurde ermittelt. Sowohl das aus Leber partiell angereicherte als auch das bakterielle Enzym bedarf der Gegenwart von Mg-Ionen und ist durch SH-blockierende Reagenzien wie p-Chlor-mercuribenzoat hemmbar. Unterschiede in der Proteinstruktur von tierischem und bakteriellem Enzym gehen aus der verschiedenen Abhängigkeit der Wirksamkeit von der Wasserstoffionen-Konzentration hervor.

2) a) In Extrakten von Mycobacterium-Rohkulturen wurde ein p-Nitroacetanilid hydrolysierendes Enzym nachgewiesen und einige seiner Eigenschaften untersucht.

b) Mit Hilfe des bei 1 a) beschriebenen optischen Tests wurde die Gegenwart von Acetacetat-aktivierendem Enzym in Mycobacterium nachgewiesen.

c) Eine von der Gegenwart von Adenosintriphosphat abhängige Bildung von Acetessigsäure aus Acetyl-Coenzym A wurde festgestellt.

3) a) Zur Kenntnis der optischen Eigenschaften von β -Methyl-crotonyl-Coenzym A wurde S-(β -Methyl-crotonyl)-N-succinyl-cysteamin dargestellt und untersucht. Das Spektrum besitzt eine gewisse Ähnlichkeit mit dem des Thiolesters der Isocrotonsäure.

b) Zur Kenntnis der Stabilität einiger Coenzym A-Derivate wurden Modellthiolester der Glutar-, β -Methyl-glutar- und β -Hydroxy- β -methyl-glutar-säure untersucht. Der Einfluss der β -Substituenten bei der alkalischen Hydrolyse gleicht dem für Sauerstoffester beschriebenen; die Geschwindigkeitskonstanten (25°) verhalten sich wie 100 : 40 : 58. Ein sehr starker reaktionsmindernder Einfluss zeigte sich bei der Ammonolyse und Hydroxylaminolyse; das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten beträgt 100 : 12 : 5 (24°) bei Ammonolyse und 100 : 9 : 4 (30°) bei Hydroxylaminolyse.

Literaturverzeichnis

- 1) L. Ruzicka, *Experientia* 9, 357 (1953)
- 2) J. Bonner, B. Arreguin, *Arch. Biochem.* 21, 109 (1949)
- 3) F. Lynen, E. Reichert, L. Rueff, *Liebigs Ann. Chem.* 574, 1 (1951)
- 4) F. Lynen, Vortrag bei der Chem. Gesellschaft Freiburg,
(16. Nov. 1951), vgl. *Nature* 174, 962 (1954)
- 5) K. Bloch, *Harvey Lectures Ser.* 48, 68 (1952/53)
- 6) F. Lipmann, *Science* 120, 855 (1954)
- 7) R. O. Brady, S. Gurin, *J. Biol. Chem.* 189, 371 (1951)
- 8) F. Lynen, *Angew. Chemie* 67, 463 (1955)
- 9) J. L. Rabinowitz, S. Gurin, *J. Biol. Chem.* 208, 307 (1954)
- 10) J. A. Johnston, D. W. Racusen, J. Bonner, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 40, 1031
(1954)
- 11) J. L. Rabinowitz, *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1295 (1955)
- 12) J. L. Rabinowitz, S. Gurin, *J. Am. Chem. Soc.* 76, 5168 (1954)
- 13) H. Rudney, *J. Am. Chem. Soc.* 76, 2595 (1954)
- 14) H. Rudney, *Fed. Proc.* 13, 286 (1954)
- 15) K. Bloch, L. C. Clark, L. Harary, *J. Biol. Chem.* 211, 687 (1954)
- 16) H. P. Klein, F. Lipmann, *J. Biol. Chem.* 203, 95, 101 (1953)
- 17) D. E. Wolf, C. H. Hoffman, P. E. Aldrich, H. R. Skeggs,
L. D. Wright, K. Folkers, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4499 (1956)
- 18) L. D. Wright, E. L. Cresson, H. R. Skeggs, G. D. E. MacRae,
C. H. Hoffman, D. E. Wolf, K. Folkers, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 5273 (1956)
- 19) P. A. Tavormina, M. H. Gibbs, J. W. Huff, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4498 (1956)
- 20) B. K. Bachhawat, W. G. Robinson, M. J. Coon, *J. Am. Chem. Soc.* 76,
3098 (1954)
- 21) H. Rudney, *Fed. Proc.* 16, 179 (1957)
- 22) K. Decker, unveröffentlicht
- 23) H. Rudney, T. G. Farkas, *Fed. Proc.* 14, 757 (1955)
- 24) B. K. Bachhawat, W. G. Robinson, M. J. Coon, *J. Biol. Chem.* 216, 727 (1955)
- 25) J. Knappe, Diplomarbeit, Universität München 1956
- 26) A. Tabor, A. H. Mehler, E. R. Stadtman, *J. Biol. Chem.* 204, 127 (1953)
- 27) H. Hilz, J. Knappe, E. Ringelmann, F. Lynen, *Biochem. Z.*, im Druck (1957)
- 28) M. J. Coon, *Fed. Proc.* 14, 762 (1955)
- 29) J. R. Stern, S. Ochoa, F. Lynen, *J. Biol. Chem.* 198, 313 (1952)
- 30) E. J. Simon, D. Shemin, *J. Am. Chem. Soc.* 75, 2520 (1953)
- 31) Th. Wieland, L. Rueff, *Angew. Chemie* 65, 186 (1953)
- 32) F. Lynen, S. Ochoa, *Biochem. Biophys. Acta* 12, 299 (1953)
- 33) P. G. Walker, *The Biochem. J.* 58, 699 (1954)
- 34) B. K. Bachhawat, J. F. Woessner, M. J. Coon, *Fed. Proc.* 15, 214 (1956)

- 35) H. G. Schlegel, persönliche Mitteilung
- 36) D. E. Green, S. Mii, H. R. Mahler, R. M. Bock, J. Biol. Chem. 206, 1 (1954)
- 37) W. Seubert, F. Lynen, J. Am. Chem. Soc. 75, 2787 (1953)
- 38) B. K. Bachhawat, W. G. Robinson, M. J. Coon, J. Biol. Chem. 219, 539 (1956)
- 39) H. Lineweaver, D. Burk, J. Am. Chem. Soc. 56, 658 (1934)
- 40) F. Lynen, D. Reinwein, unveröffentlicht
- 41) C. H. Fiske, Y. Subbarow, J. Biol. Chem. 66, 375 (1925)
- 42) R. M. Flynn, M. E. Jones, F. Lipmann, J. Biol. Chem. 211, 791 (1954)
- 43) R. K. Crane, F. Lipmann, J. Biol. Chem. 201, 235 (1953)
- 44) P. Berg, J. Biol. Chem. 222, 991 (1956)
- 45) R. A. Smith, I. F. Frank, I. C. Gunsalus, Fed. Proc. 16, 251 (1957)
- 46) M. B. Hoagland, E. B. Keller, P. C. Zamecnik, J. Biol. Chem. 218, 345
(1956)
- 47) R. S. Bandurski, L. G. Wilson, C. L. Squires, J. Am. Chem. Soc. 78, 6409
(1956)
- 48) P. W. Robbins, F. Lipmann, J. Am. Chem. Soc. 78, 2652 (1956)
- 49) M. Flavin, H. Castro-Mendoza, W. S. Beck, Fed. Proc. 15, 252 (1956)
- 50) M. Flavin, H. Castro-Mendoza, S. Ochoa, Biochem. Biophys. Acta 20,
591 (1956)
- 51) B. K. Bachhawat, M. J. Coon, J. Am. Chem. Soc. 79, 1505 (1957)
- 52) M. E. Jones, F. Lipmann, H. Hilz, F. Lynen, J. Am. Chem. Soc. 75,
3285 (1953)
- 53) J. R. Stern, A. del Campillo, J. Biol. Chem. 218, 985 (1956)
- 54) H. A. Lardy, P. Peanasky, Physiolog. Rev. 33, 560 (1953)
- 55) H. C. Lichstein, J. Biol. Chem. 212, 217 (1955); Fed. Proc. 16, 211 (1957)
- 56) J. R. Stern, S. Ochoa, J. Biol. Chem. 191, 161 (1951)
- 57) J. R. Stern, M. J. Coon, A. del Campillo, Nature 171, 28 (1953)
- 58) H. R. Mahler, S. J. Wakil, R. M. Bock, J. Biol. Chem. 204, 453 (1953)
- 59) H. Hilz, unveröffentlicht
- 60) W. Seubert, Dissertation, Universität München 1955
- 61) W. A. Waters, Physical Aspects of Organic Chemistry, New York 1954
- 62) H. Eggerer, Dissertation, Universität München 1957
- 63) F. Lipmann, L. C. Tuttle, J. Biol. Chem. 159, 21 (1945)
- 64) E. R. Stadtman, in „Methods in Enzymology“ III, 230; New York 1956
- 65) F. Lynen, Liebig's Ann. Chem. 574, 33 (1951)
- 66) R. Grunert, P. Phillips, Arch. Biochem. 30, 217 (1951)
- 67) L. H. Noda, S. A. Kuby, H. A. Lardy, J. Am. Chem. Soc. 75, 913 (1953)
- 68) P. Berg, Fed. Proc. 16, 152 (1957)
- 69) J. R. Stern, in „Methods in Enzymology“ I, 559; New York 1955
- 70) G. Ljunggren, Biochem. Z. 145, 422 (1924)

- 71) N. L. Edson, Biochem. J. 29, 2082 (1935);
vgl. W. W. Umbreit et al., „Manometric
Techniques“, Minneapolis 1945
- 72) „Inorganic Synthesis“ III, 106
- 73) M. Martland, R. Robison, Biochem. J. 20, 847 (1926)
- 74) M. Kunitz, J. Gen. Physiol. 35, 423 (1952)
- 75) P. D. Boyer, J. Am. Chem. Soc. 76, 4331 (1954)
- 76) H. Hagiwara, Bull. Inst. Phys. Chem. Research (Tokyo) 20, 25 (1941)
- 77) E. R. Stadtman, „Methods in Enzymology“ III, 939; New York 1956
- 78) M. Grassl, Dissertation, Universität München 1957
- 79) R. B. Hurlbert, H. Schmitz, A. F. Brumm, R. van Potter,
J. Biol. Chem. 209, 23 (1954)
- 80) W. Seubert, unveröffentlicht
- 81) R. Kuhn, G. Quadbeck, Chem. Ber. 84, 844 (1951)
- 82) W. Thorn, G. Pfeleiderer, A. Frowein, I. Ross, Pflügers Arch. ges. Physiol.
261, 334 (1955)
- 83) H. Adam, Dissertation, Universität Marburg 1955
- 84) G. Beisenherz, H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade,
E. Meyer-Arendt, G. Pfeleiderer, Z. f. Naturforsch. 8b, 555 (1953)
- 85) D. P. Evans, J. J. Gordon, H. B. Watson, J. Chem. Soc. 1938, 1439
- 86) B. K. Bachhawat, F. P. Kupiecki, M. J. Coon, Fed. Proc. 16, 148 (1957)
- 87) J. S. Fritz, M. Q. Freehand, Analytic. Chem. 26, 1593 (1954)
- 88) H. Eggerer, Diplomarbeit, Universität München 1956
- 89) O. Warburg, W. Christian, Biochem. Z. 310, 384 (1941)
- 90) M. Grassl, Diplomarbeit, Universität München 1956.

Lebenslauf

Am 31. März 1929 wurde ich in München als Sohn des Akademieprofessors Dr. Heinrich Knappe und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Bauschinger geboren. Von April 1935 bis März 1939 besuchte ich die Volksschule und anschliessend die Luitpold-Oberrealschule in München, von der ich im Juli 1947 das Reifezeugnis erhielt. Nach Ableistung des Aufbaudienstes an der Universität München begann ich dort im Sommersemester 1948 mit dem Studium der Chemie. Im Dezember 1951 legte ich die Diplom-Vorprüfung und im Januar 1954 die Diplom-Hauptprüfung für Chemiker ab. Von Juni 1954 bis Juli 1955 führte ich die Diplomarbeit und anschliessend die Doktorarbeit unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Lynen aus.

